

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-65120

(P2004-65120A)

(43) 公開日 平成16年3月4日 (2004.3.4)

(51) Int. Cl. ⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

2 G 0 4 5

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 45/00

4 B 0 2 4

A 6 1 P 1/04

A 6 1 P 1/04

4 B 0 6 3

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 29/00

4 C 0 8 4

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/02

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 151 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-229705 (P2002-229705)

(22) 出願日 平成14年8月7日 (2002.8.7)

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(74) 代理人 100121588

弁理士 五十部 穰

(72) 発明者 永坂 曜介

大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番9
8号 住友製薬株式会社内

(72) 発明者 渡辺 孝正

大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番9
8号 住友製薬株式会社内

(72) 発明者 木村 徹

大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番9
8号 住友製薬株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性腸疾患の疾患マーカー及びその利用

(57) 【要約】

【課題】炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) を反映する疾患マーカー、該疾患マーカーを利用したIBDの検出方法、該疾患の改善に有用な薬物のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 F c y R I I I a 遺伝子の塩基配列、F c y R I I I b 遺伝子の塩基配列、M i g 遺伝子の塩基配列、N R G - 2 遺伝子の塩基配列、ヘキシキナーゼ 3 遺伝子の塩基配列、H M 7 4 遺伝子の塩基配列、R E G I I I 遺伝子の塩基配列、L P A P 遺伝子の塩基配列、M i p - 1 β 遺伝子の塩基配列、L - セレクチン遺伝子の塩基配列、E G F L 6 遺伝子の塩基配列、I D O 遺伝子の塩基配列、I L - 8 遺伝子の塩基配列、C D 1 1 c 遺伝子の塩基配列またはT L R 2 遺伝子の塩基配列において、連続する少なくとも 1 5 塩基を有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを、IBDの疾患マーカーとして利用する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

FcγRIIIa遺伝子の塩基配列、FcγRIIIb遺伝子の塩基配列、Mig遺伝子の塩基配列、NRG-2遺伝子の塩基配列、ヘキソキナーゼ3遺伝子の塩基配列、HM74遺伝子の塩基配列、REGIII遺伝子の塩基配列、LPAP遺伝子の塩基配列、Mip-1β遺伝子の塩基配列、L-セレクチン遺伝子の塩基配列、EGFL6遺伝子の塩基配列、IDO遺伝子の塩基配列、IL-8遺伝子の塩基配列、CD11c遺伝子の塩基配列またはTLR2遺伝子の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる、炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; 以下IBD)の疾患マーカー。

10

【請求項2】

IBDの検出においてプローブまたはプライマーとして使用される請求項1記載の疾患マーカー。

【請求項3】

下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、IBDの検出方法：(a)被験者の生体試料から調製されたRNAまたはそれから転写された相補的ポリヌクレオチドと請求項1または2に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、(b)該疾患マーカーに結合した生体試料由来のRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、

20

(c)上記(b)の測定結果に基づいて、IBDの罹患を判断する工程。

【請求項4】

工程(c)におけるIBDの罹患の判断が、被験者について得られる測定結果を正常者について得られる測定結果と対比して、疾患マーカーへの結合量が増大していることを指標として行われる、請求項3に記載のIBDの検出方法。

【請求項5】

FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2を認識する抗体を含有する、IBDの疾患マーカー。

30

【請求項6】

IBDの検出においてプローブとして使用される請求項5記載の疾患マーカー。

【請求項7】

下記の工程(a)、(b)及び(c)を含むIBDの検出方法：

(a)被験者の生体試料から調製されたタンパク質と請求項5または6に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、

(b)該疾患マーカーに結合した生体試料由来のタンパク質を、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、

(c)上記(b)の測定結果に基づいて、IBDの罹患を判断する工程。

【請求項8】

40

工程(c)におけるIBDの罹患の判断が、被験者について得られる測定結果を正常者について得られる測定結果と対比して、疾患マーカーへの結合量が増大していることを指標として行われる請求項7記載のIBDの検出方法。

【請求項9】

下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a)被験物質とFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子

50

、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子のいずれかを発現可能な細胞とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた細胞におけるFc γ R IIIa 遺伝子、Fc γ R IIIb 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子のいずれかの発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞における上記に対応する遺伝子の発現量と比較する工程、

10

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、Fc γ R IIIa 遺伝子、Fc γ R IIIb 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子のいずれかの発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【請求項10】

下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Fc γ R IIIa、Fc γ R IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c およびTLR2 のいずれかの発現を抑制する物質のスクリーニング方法：

20

(a) 被験物質とFc γ R IIIa、Fc γ R IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c およびTLR2 のいずれかを発現可能な細胞とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた細胞における Fc γ R IIIa、Fc γ R IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c およびTLR2 のいずれかの発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞における上記に対応するタンパク質の発現量と比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、Fc γ R IIIa、Fc γ R IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c およびTLR2 のいずれかの発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

30

【請求項11】

下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、Fc γ R IIIa、Fc γ R IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c またはTLR2 の機能または活性を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質を Fc γ R IIIa、Fc γ R IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c またはTLR2 に接触させる工程、

40

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるFc γ R IIIa、Fc γ R IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c またはTLR2 の機能または活性を測定し、該機能または活性を被験物質を接触させない場合のFc γ R IIIa、Fc γ R IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c またはTLR2 の機能または活性と比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、Fc γ R IIIa、Fc γ R IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip

50

ー1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能または活性の低下をもたらす被験物質を選択する工程。

【請求項12】

IBDの改善または治療剤の有効成分を探索するための方法である、請求項9乃至11のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項13】

FcyR IIIa遺伝子、FcyR IIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG III遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現を抑制する物質を有効成分とする、IBDの改善または治療剤。

10

【請求項14】

FcyR IIIa遺伝子、FcyR IIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG III遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現を抑制する物質が請求項9記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項13記載のIBDの改善または治療剤。

【請求項15】

FcyR IIIa、FcyR IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現量、機能または活性を抑制する物質を有効成分とする、IBDの改善または治療剤。

20

【請求項16】

FcyR IIIa、FcyR IIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現量、機能または活性を抑制する物質が、請求項10または11に記載のスクリーニング法により得られるものである、請求項15記載のIBDの改善または治療剤。

【発明の詳細な説明】

30

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease；以下IBDと略する）の診断に有用な疾患マーカーに関する。より詳細には、本発明は、IBDの診断においてプライマーまたは検出プローブとして有効に利用できる疾患マーカーに関する。また本発明は、かかる疾患マーカーを利用したIBDの検出方法（診断方法）に関する。

【0002】

さらに本発明は、上記疾患マーカーを利用して、IBDの改善薬または治療薬として有効な物質をスクリーニングする方法、並びに該方法によって得られる上記物質を有効成分とするIBDの改善薬または治療薬に関する。

40

【0003】

【従来の技術】

腸は、生体の生命活動に必須である栄養分・水分を消化吸収する器官である。一方で病原体などの異物を排除するための免疫防御機能も備えており相反する性質をバランスよく制御することで生命の維持を担っている器官でもある。しかしこれら機能バランスに異常が生じると、この動的平衡状態が破綻し様々な腸疾患が引き起こされることが知られている。特に近年患者数が増加してきている炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease；IBDと略される）は、スルファサラジン等の5-アミノサリチル酸製剤やステロイド等の薬物療法では満足できる治療効果が得られておらず、そのた

50

め腸切除手術、白血球除去等で治療している状態であり、よりよい薬物が必要とされている。

【0004】

IBDは、その病態から潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UCと略される) とクローン病 (Crohn's disease; CDと略される) とに分類されている。近年、抗TNF抗体などのタンパク製剤がクローン病の治療剤として有効であることが知られている。しかしながら高価な薬剤でありステロイド耐性の患者のみの適応であり、また潰瘍性大腸炎に対する効果も弱いことから、未だ満足できる医療状況に無いのが現状である。

さらに、個々の患者によって薬物療法への反応が異なっており、現在用いられている治療薬すべてにおいて薬物療法に反応しないIBD患者が存在している。また、遺伝子多型と疾患感受性の解析からインターロイキン-1の多型やNOD2遺伝子の多型が疾患原因遺伝子と考えられるケースがあり、基礎医学的な研究においても個々の患者による病態発症の遺伝的背景に差異のあることが明らかになりつつある。

【0005】

最近の医療現場では、IBDに限らず、個々の患者の症状に合わせて治療法を的確に選択することが望まれるようになってきている。高齢化社会でのQOL (Quality of life) 向上の必要性が認識されてきた近年では、特に、万人に共通した治療ではなく、個々の患者の症状に合わせて適切な治療が施されることが強く求められている。このような所謂テーラーメイド治療を行うためには、個々の疾患について患者の症状やその原因 (遺伝的背景) を的確に反映する疾患マーカーが有用であり、その探索並びに開発を目指した研究が精力的に行われているのが現状である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、IBDの診断及び治療に有用な疾患マーカーを提供することを目的とする。より詳細には、本発明はIBDを特異的に反映した疾患マーカーを提供することを目的とする。さらに本発明は該疾患マーカーを利用したIBDの検出方法 (遺伝子診断方法)、該疾患の改善または治療に有用な薬物をスクリーニングする方法、並びに該疾患の改善または治療に有用な薬物を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行っていたところ、従来はIBDとの関連が明らかではなかった以下の遺伝子: FcγR I I I a 遺伝子、FcγR I I I b 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子が、IBD患者 (潰瘍性大腸炎及びクローン病) の結腸病変組織において、結腸正常組織 (正常人の結腸組織) と比較して有意に発現上昇していることを見出した。さらにこれらの遺伝子は、IBD病態関連組織である消化管系組織、およびIBDの発症機構に関与する免疫系組織以外の臓器では、ほとんど発現していないことを見出した。

【0008】

以上のように本発明者らは、消化管が傷害する自己免疫疾患と考えられているIBDにおいて、これらFcγR I I I a 遺伝子、FcγR I I I b 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子、及びこれらの発現産物 (タンパク質) が、優れた疾患マーカーであるとの知見を得た。さらに、これら遺伝子の発現抑制、または当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現抑制や機能 (活性) 抑制を指標としたスクリーニング系は、IBDの予防、改善または治療薬の探索に有効であるとの知見を得た。

本発明はかかる知見を基礎にして完成するに至ったものである。

【0009】

すなわち、本発明は、下記に掲げるものである：

(1) FcγR I I I a 遺伝子の塩基配列、FcγR I I I b 遺伝子の塩基配列、Mig 遺伝子の塩基配列、NRG-2 遺伝子の塩基配列、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子の塩基配列、HM74 遺伝子の塩基配列、REG I I I 遺伝子の塩基配列、LPAP 遺伝子の塩基配列、Mip-1β 遺伝子の塩基配列、L-セレクチン遺伝子の塩基配列、EGFL6 遺伝子の塩基配列、IDO 遺伝子の塩基配列、IL-8 遺伝子の塩基配列、CD11c 遺伝子の塩基配列または TLR2 遺伝子の塩基配列において、連続する少なくとも 15 塩基を有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる、IBD の疾患マーカー、

10

(2) IBD の検出においてプローブまたはプライマーとして使用される前記 (1) 記載の疾患マーカー、

(3) 下記の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、IBD の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製された RNA またはそれから転写された相補的ポリヌクレオチドと前記 (1) または (2) に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、

(b) 該疾患マーカーに結合した生体試料由来の RNA または該 RNA から転写された相補的ポリヌクレオチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、

(c) 上記 (b) の測定結果に基づいて、IBD の罹患を判断する工程、

(4) 工程 (c) における IBD の罹患の判断が、被験者について得られる測定結果を正常者について得られる測定結果と対比して、疾患マーカーへの結合量が増大していることを指標として行われる、前記 (3) に記載の IBD の検出方法、

20

(5) FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c または TLR2 を認識する抗体を含有する、IBD の疾患マーカー、

(6) IBD の検出においてプローブとして使用される前記 (5) 記載の疾患マーカー、

(7) 下記の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む IBD の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製されたタンパク質と前記 (5) または (6) に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、

30

(b) 該疾患マーカーに結合した生体試料由来のタンパク質を、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、

(c) 上記 (b) の測定結果に基づいて、IBD の罹患を判断する工程、

(8) 工程 (c) における IBD の罹患の判断が、被験者について得られる測定結果を正常者について得られる測定結果と対比して、疾患マーカーへの結合量が増大していることを指標として行われる前記 (7) 記載の IBD の検出方法、

(9) 下記の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む、FcγR I I I a 遺伝子、FcγR I I I b 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子および TLR2 遺伝子のいずれかの発現を抑制する物質のスクリーニング方法：

40

(a) 被験物質と FcγR I I I a 遺伝子、FcγR I I I b 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子および TLR2 遺伝子のいずれかを発現可能な細胞とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた細胞における FcγR I I I a 遺伝子、FcγR I I I b 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン遺伝

50

子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞における上記に対応する遺伝子の発現量と比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、FcγR I II a遺伝子、FcγR I II b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG I II 遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現量を減少させる被験物質を選択する工程、

(10) 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、FcγR I II a、FcγR I II b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I II、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現を抑制する物質のスクリーニング方法： 10

(a) 被験物質とFcγR I II a、FcγR I II b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I II、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかを発現可能な細胞とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた細胞における FcγR I II a、FcγR I II b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I II、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞における上記 20
に対応するタンパク質の発現量と比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、FcγR I II a、FcγR I II b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I II、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現量を減少させる被験物質を選択する工程、

(11) 下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む、FcγR I II a、FcγR I II b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I II、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能または活性を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質を FcγR I II a、FcγR I II b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I II、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2に接触させる工程、 30

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるFcγR I II a、FcγR I II b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I II、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能または活性を測定し、該機能または活性を被験物質を接触させない場合のFcγR I II a、FcγR I II b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I II、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能または活性と比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、FcγR I II a、FcγR I II b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I II、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能または活性の低下をもたらす被験物質を選択する工程、 40

(12) IBDの改善または治療剤の有効成分を探索するための方法である、前記(9)乃至(11)のいずれかに記載のスクリーニング方法、

(13) FcγR I II a遺伝子、FcγR I II b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG I II 遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現を抑制する物質を有効成分とする、IBDの改善または治療剤、 50

(14) FcγR I I I a 遺伝子、FcγR I I I b 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子のいずれかの発現を抑制する物質が前記(9)記載のスクリーニング法により得られるものである、前記(13)記載のIBDの改善または治療剤、

(15) FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c およびTLR2 のいずれかの発現量、機能または活性を抑制する物質を有効成分とする、IBDの改善または治療剤、ならびに

(16) FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c およびTLR2 のいずれかの発現量、機能または活性を抑制する物質が、前記(10)または(11)に記載のスクリーニング法により得られるものである、前記(15)記載のIBDの改善または治療剤。

【0010】

上記のように、本発明によれば、IBDの疾患マーカー、該疾患の検出系、FcγR I I I a 遺伝子、FcγR I I I b 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子またはTLR2 遺伝子の発現を抑制する物質のスクリーニング系、FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c またはTLR2 の発現、機能もしくは活性を抑制する物質のスクリーニング系、およびこれらの物質を有効成分とするIBDの改善および治療剤が提供される。

【0011】

本発明は、前述するように、FcγR I I I a 遺伝子、FcγR I I I b 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子が、IBD患者(潰瘍性大腸炎及びクローン病)の結腸病変組織において、結腸正常組織(正常者の結腸組織)と比較して有意に発現上昇しており、またこれらの遺伝子は、正常組織においては、IBD病態関連組織である消化管組織、およびIBDの発症機構に関与する免疫系組織以外の臓器では、ほとんど発現していないことを見出したことに基づくものである。従って、これらの遺伝子及びその発現産物〔タンパク質、(ポリ)(オリゴ)ペプチド〕は、IBDの解明、診断、予防及び治療に有効に利用することができ、かかる利用によって医学並びに臨床学上、有用な情報や手段を得ることができる。さらに、個体(生体組織)における、上記遺伝子の発現またはその発現産物の検出、または該遺伝子の変異またはその発現異常の検出は、IBDの解明や診断に有効に利用することができる。

【0012】

また、これらの遺伝子およびその発現産物並びにそれらからの派生物(例えば、遺伝子断片、抗体など)は、FcγR I I I a 遺伝子、FcγR I I I b 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子またはTLR2 遺伝子の発現を抑制する物質、およびFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c またはTLR2 の発現、機能もしくは活性を抑制する物質のスクリーニングに有用であり、該スクリーニングによって得られる物質

は、IBDの予防、改善および治療薬として有効である。更に、これらの遺伝子のアンチセンス核酸（アンチセンスヌクレオチド）は、IBDの予防、改善及び治療薬として有用である。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本明細書において、アミノ酸、（ポリ）ペプチド、（ポリ）ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定 [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」（日本国特許庁編）、および当該分野における慣用記号に従う。

【0014】

本明細書において「遺伝子」または「DNA」とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAを包含する趣旨で用いられる。またその長さによって特に制限されるものではない。従って、本明細書において遺伝子（DNA）とは、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNAおよびcDNAを含む1本鎖DNA（正鎖）並びに該正鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（相補鎖）、およびこれらの断片のいずれもが含まれる。また当該「遺伝子」または「DNA」には、特定の塩基配列（配列番号：1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14及び29）で示される「遺伝子」または「DNA」だけでなく、これらによりコードされるタンパク質と生物学的機能が同等であるタンパク質（例えば同族体（ホモログやスプライスバリエーションなど）、変異体及び誘導体）をコードする「遺伝子」または「DNA」が包含される。かかる同族体、変異体または誘導体をコードする「遺伝子」または「DNA」としては、具体的には、後述の（1-1）項に記載のストリンジェントな条件下で、前記の配列番号：1～14及び29で示されるいずれかの特定塩基配列の相補配列とハイブリダイズする塩基配列を有する「遺伝子」または「DNA」を挙げることができる。

【0015】

例えばヒト由来のタンパク質のホモログをコードする遺伝子としては、当該タンパク質をコードするヒト遺伝子に対応するマウスやラットなど他生物種の遺伝子が例示でき、これらの遺伝子（ホモログ）は、HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>)により同定することができる。具体的には、特定ヒト塩基配列をBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877, 1993, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) にかけて一致する (Scoreが最も高く、E-valueが0でかつIdentityが100%を示す) 配列のアクセッション番号を取得する。そのアクセッション番号をUniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) に入力して得られたUniGene Cluster ID (Hs. で示す番号) をHomoloGeneに入力する。結果として得られた他生物種遺伝子とヒト遺伝子との遺伝子ホモログの相関を示したリストから、特定の塩基配列で示されるヒト遺伝子に対応する遺伝子（ホモログ）としてマウスやラットなど他生物種の遺伝子を選抜することができる。なお、遺伝子またはDNAは、機能領域の別を問うものではなく、例えば発現制御領域、コード領域、エキソン、またはイントロンを含むことができる。

【0016】

従って本明細書において「FcγRIIIa遺伝子」または「FcγRIIIaのDNA」といった用語を用いる場合、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号29）で示されるヒトFcγRIIIa遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：29に記載のヒトFcγRIIIa遺伝子 (GenBank Access

sion No. NM_000569) や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

【0017】

また本明細書において「FcγRIIb 遺伝子」または「FcγRIIb の DNA」といった用語を用いる場合、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号 1）で示されるヒト FcγRIIb 遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：1 に記載のヒト FcγRIIb 遺伝子（GenBank Accession No. NM_000570）や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

10

【0018】

また本明細書において「Mig 遺伝子」または「Mig の DNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号 2）で示されるヒト Mig 遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：2 に記載のヒト Mig 遺伝子（GenBank Accession No. S60728）や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

【0019】

また本明細書において「NRG-2 遺伝子」または「NRG-2 の DNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号 3）で示されるヒト NRG-2 遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：3 に記載のヒト NRG-2 遺伝子（GenBank Accession No. AB005060）や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

20

【0020】

また本明細書において「ヘキソキナーゼ 3 遺伝子」または「ヘキソキナーゼ 3 の DNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号 4）で示されるヒトヘキソキナーゼ 3 遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：4 に記載のヒトヘキソキナーゼ 3 遺伝子（GenBank Accession No. U51333）や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

30

【0021】

また本明細書において「HM74 遺伝子」または「HM74 の DNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号 5）で示されるヒト HM74 遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：5 に記載のヒト HM74 遺伝子（GenBank Accession No. D10923）や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_030701）、ラットホモログが包含される。

40

【0022】

また本明細書において「REG III 遺伝子」または「REG III の DNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号 6）で示されるヒト REG III 遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：6 に記載のヒト REG III 遺伝子（GenBank Accession No. NM_002580）や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_011036）、ラットホモログ（GenBank Accession No. D23676）などが包含される。

【0023】

50

また本明細書において「LPAP遺伝子」または「LPAPのDNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号7）で示されるヒトLPAP遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：7に記載のヒトLPAP遺伝子（GenBank Accession No. X81422）や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_016933）、ラットホモログなどが包含される。

【0024】

また本明細書において「Mip-1 β 遺伝子」または「Mip-1 β のDNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号8）で示されるヒトMip-1 β 遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：8に記載のヒトMip-1 β 遺伝子（GenBank Accession No. J04130）や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_013652）、ラットホモログ（GenBank Accession No. U06434）などが包含される。

【0025】

また本明細書において「L-セレクチン遺伝子」または「L-セレクチンのDNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号9）で示されるヒトL-セレクチン遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：9に記載のヒトL-セレクチン遺伝子（GenBank Accession No. NM_000655）や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_011346）、ラットホモログ（GenBank Accession No. NM_019177）などが包含される。

【0026】

また本明細書において「EGFL6遺伝子」または「EGFL6のDNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号10）で示されるヒトEGFL6遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：10に記載のヒトEGFL6遺伝子（GenBank Accession No. NM_015507）や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_019397）、ラットホモログなどが包含される。

【0027】

また本明細書において「IDO遺伝子」または「IDOのDNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号11）で示されるヒトIDO遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：11に記載のヒトIDO遺伝子（GenBank Accession No. NM_002164）や、そのマウスホモログ、ラットホモログ（GenBank Accession No. NM_023973）などが包含される。

【0028】

また本明細書において「IL-8遺伝子」または「IL-8のDNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号12）で示されるヒトIL-8遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：12に記載のヒトIL-8遺伝子（GenBank Accession No. NM_000584）や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

【0029】

また本明細書において「CD11c遺伝子」または「CD11cのDNA」といった用語

10

20

30

40

50

を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号 13）で示されるヒト CD11c 遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：13 に記載のヒト CD11c 遺伝子（GenBank Accession No. NM_000887）や、そのマウスホモログ、ラットホモログ（GenBank Accession No. NM_031691）などが包含される。

【0030】

また本明細書において「TLR2 遺伝子」または「TLR2 の DNA」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定塩基配列（配列番号 14）で示されるヒト TLR2 遺伝子（DNA）や、その同族体、変異体及び誘導体などをコードする遺伝子（DNA）を包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：14 に記載のヒト TLR2 遺伝子（GenBank Accession No. U88878）や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_011905）、ラットホモログなどが包含される。

【0031】

本明細書において「ポリヌクレオチド」とは、RNA および DNA のいずれをも包含する趣旨で用いられる。なお、上記 DNA には、cDNA、ゲノム DNA、及び合成 DNA のいずれもが含まれる。また上記 RNA には、total RNA、mRNA、rRNA、及び合成の RNA のいずれもが含まれる。

【0032】

本明細書において「タンパク質」または「（ポリ）ペプチド」には、特定のアミノ酸配列（配列番号：15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 または 30）で示される「タンパク質」または「（ポリ）ペプチド」だけでなく、これらと生物学的機能が同等であることを限度として、その同族体（ホモログやスプライスバリエント）、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などが包含される。ここでホモログとしては、ヒトのタンパク質に対応するマウスやラットなど他生物種のタンパク質が例示でき、これらは HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>) により同定された遺伝子の塩基配列から演繹的に同定することができる。また変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、及び人為的に欠失、置換、付加および挿入されることによって改変されたアミノ酸配列を有する変異体が包含される。なお、上記変異体としては、変異のないタンパク質または（ポリ）ペプチドと、少なくとも 70%、好ましくは 80%、より好ましくは 95%、さらにより好ましくは 97% 相同なものを挙げることができる。またアミノ酸修飾体には、天然に存在するアミノ酸修飾体、天然に存在しないアミノ酸修飾体が包含され、具体的にはアミノ酸のリン酸化体が挙げられる。

【0033】

従って本明細書において「FcγR IIIa タンパク質」または単に「FcγR IIIa」といった用語を用いる場合、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号 30）で示されるヒト FcγR IIIa やその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：30（GenBank Accession No. NM_000569）に記載のアミノ酸配列を有するヒト FcγR IIIa や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

【0034】

また本明細書において「FcγR IIIb タンパク質」または単に「FcγR IIIb」といった用語を用いる場合、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号 15）で示されるヒト FcγR IIIb やその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：15（GenBank Accession No. NM_000570）に記載のアミノ酸配列を有するヒト FcγR IIIb や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含

10

20

30

40

50

される。

【0035】

また本明細書において「Migタンパク質」または単に「Mig」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号16）で示されるヒトMigやその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：16（GenBank Accession No. S60728）に記載のアミノ酸配列を有するヒトMigや、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

【0036】

また本明細書において「NRG-2タンパク質」または単に「NRG-2」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号17）で示されるヒトNRG-2やその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：17（GenBank Accession No. AB005060）に記載のアミノ酸配列を有するヒトNRG-2や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

10

【0037】

また本明細書において「ヘキソキナーゼ 3タンパク質」または単に「ヘキソキナーゼ 3」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号18）で示されるヒトヘキソキナーゼ 3やその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：18（GenBank Accession No. U51333）に記載のアミノ酸配列を有するヒトヘキソキナーゼ 3や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

20

【0038】

また本明細書において「HM74タンパク質」または単に「HM74」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号19）で示されるヒトHM74やその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：19（GenBank Accession No. D10923）に記載のアミノ酸配列を有するヒトHM74や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_030701）、ラットホモログが包含される。

30

【0039】

また本明細書において「REG IIIタンパク質」または単に「REG III」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号20）で示されるヒトREG IIIやその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：20（GenBank Accession No. NM_002580）に記載のアミノ酸配列を有するヒトREG IIIや、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_011036）、ラットホモログ（GenBank Accession No. D23676）などが包含される。

40

【0040】

また本明細書において「LPAPタンパク質」または単に「LPAP」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号21）で示されるヒトLPAPやその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：21（GenBank Accession No. X81422）に記載のアミノ酸配列を有するヒトLPAPや、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_016933）、ラットホモログなどが包含される。

【0041】

また本明細書において「Mip-1 β タンパク質」または単に「Mip-1 β 」といった

50

用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号22）で示されるヒトMip-1 β やその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：22（GenBank Accession No. J04130）に記載のアミノ酸配列を有するヒトMip-1 β や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_013652）、ラットホモログ（GenBank Accession No. U06434）などが包含される。

【0042】

また本明細書において「L-セレクチンタンパク質」または単に「L-セレクチン」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号23）で示されるヒトL-セレクチンやその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：23（GenBank Accession No. NM_000655）に記載のアミノ酸配列を有するヒトL-セレクチンや、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_011346）、ラットホモログ（GenBank Accession No. NM_019177）などが包含される。

【0043】

また本明細書において「EGFL6タンパク質」または単に「EGFL6」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号24）で示されるヒトEGFL6やその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：24（GenBank Accession No. NM_015507）に記載のアミノ酸配列を有するヒトEGFL6や、そのマウスホモログ（GenBank Accession No. NM_019397）、ラットホモログなどが包含される。

【0044】

また本明細書において「IDOタンパク質」または単に「IDO」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号25）で示されるヒトIDOやその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：25（GenBank Accession No. NM_002164）に記載のアミノ酸配列を有するヒトIDOや、そのマウスホモログ、ラットホモログ（GenBank Accession No. NM_023973）などが包含される。

【0045】

また本明細書において「IL-8タンパク質」または単に「IL-8」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号26）で示されるヒトIL-8やその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：26（GenBank Accession No. NM_000584）に記載のアミノ酸配列を有するヒトIL-8や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

【0046】

また本明細書において「CD11cタンパク質」または単に「CD11c」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号27）で示されるヒトCD11cやその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：27（GenBank Accession No. NM_000887）に記載のアミノ酸配列を有するヒトCD11cや、そのマウスホモログ、ラットホモログ（GenBank Accession No. NM_031691）などが包含される。

【0047】

また本明細書において「TLR2タンパク質」または単に「TLR2」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列（配列番号28）で示さ

10

20

30

40

50

れるヒトTLR2やその同族体、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号：28 (GenBank Accession No. U88878) に記載のアミノ酸配列を有するヒトTLR2や、そのマウスホモログ (GenBank Accession No. NM_011905)、ラットホモログなどが包含される。

【0048】

本明細書でいう「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、またはFabフラグメントやFab発現ライブラリーによって生成されるフラグメントなどのように抗原結合性を有する上記抗体の一部が包含される。

【0049】

本明細書における「IBD」とはinflammatory bowel diseaseの略であり、日本では炎症性腸疾患と呼ばれる。病態から潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UCと略される) とクローン病 (Crohn's disease: CDと略される) に分類されている。

【0050】

さらに本明細書において「疾患マーカー」とは、IBDの罹患の有無、罹患の程度若しくは改善の有無や改善の程度を診断するために、またIBDの予防、改善または治療に有用な候補物質をスクリーニングするために、直接または間接的に利用されるものをいう。これには、IBDの罹患に関連して生体内、特に大腸組織において、発現が変動する遺伝子またはタンパク質を特異的に認識し、また結合することのできる(ポリ)(オリゴ)ヌクレオチドまたは抗体が包含される。これらの(ポリ)(オリゴ)ヌクレオチドおよび抗体は、上記性質に基づいて、生体内、組織や細胞内などで発現した上記遺伝子及びタンパク質を検出するためのプローブとして、また(オリゴ)ヌクレオチドは生体内で発現した上記遺伝子を増幅するためのプライマーとして有効に利用することができる。

【0051】

さらに本明細書において診断対象となる「生体組織」とは、IBDに伴い本発明のFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG IIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子またはTLR2遺伝子が発現上昇する組織を指す。具体的には大腸組織及びその周辺組織などを指す。

【0052】

以下、これらのFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG IIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子(以下これらの遺伝子を併せて本発明遺伝子と称する場合がある)、並びにこれらの発現産物(FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG IIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c、およびTLR2、以下これらのタンパク質を併せて本発明タンパク質と称する場合がある)、およびそれらの派生物について、具体的な用途を説明する。

【0053】

(1) IBDの疾患マーカーおよびその応用

(1-1) ポリヌクレオチド

本発明におけるFcγRIIIa遺伝子は、CD16a遺伝子もしくはFcγRIIIa遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来のFcγRIIIa遺伝子としては、配列番号29に示すポリヌクレオチドが知られており (GenBank Accession No. NM_000569)、その取得方法についてもPeltz, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 1013-1017, 1989 に記載さ

10

20

30

40

50

れるように公知である。

【0054】

本発明におけるFcγRIIb遺伝子は、CD 16b遺伝子もしくはFcγRIIb遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来のFcγRIIb遺伝子としては、配列番号1に示すポリヌクレオチドが知られており(GenBank Accession No. NM_000570)、その取得方法についてもRavetch, J. V. ら, J. Exp. Med., 170, 481-497, 1989に記載されるように公知である。

【0055】

本発明におけるMig遺伝子はmonokine induced by gamma interferon遺伝子もしくはCXCL9遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来のMig遺伝子としては、配列番号2に示すポリヌクレオチドが知られており(GenBank Accession No. S60728)、その取得方法についてもFarber, J. M. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 192, 223-230, 1993に記載されるように公知である。

【0056】

本発明におけるNRG-2遺伝子はneuregulin 2遺伝子もしくはNTAK遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来のNRG-2遺伝子としては、配列番号3に示すポリヌクレオチドが知られており(GenBank Accession No. AB005060)、その取得方法についてもCarraway, K. L. ら, Nature, 387, 512-516, 1997に記載されるように公知である。

【0057】

本発明におけるヘキソキナーゼ 3(hexokinase 3)遺伝子は公知の遺伝子である。例えばヒト由来のヘキソキナーゼ 3遺伝子としては、配列番号4に示すポリヌクレオチドが知られており(GenBank Accession No. U51333)、その取得方法についてもFuruta, H. ら, Genomics, 36, 206-209, 1996に記載されるように公知である。

【0058】

本発明におけるHM74遺伝子はchemokine receptor HM74遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来のHM74遺伝子としては、配列番号5に示すポリヌクレオチドが知られており(GenBank Accession No. D10923)、その取得方法についてもNomura, H. ら, Int. Immunol., 5, 1239-1249, 1993に記載されるように公知である。

【0059】

本発明におけるREG IIL遺伝子はpancreatitis-associated protein遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来のREG IIL遺伝子としては、配列番号6に示すポリヌクレオチドが知られており(GenBank Accession No. NM_002580)、その取得方法についてもDusetti, N. J. ら, Genomics, 19, 108-114, 1994に記載されるように公知である。

【0060】

本発明におけるLPAP遺伝子は、Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein遺伝子、もしくはprotein-tyrosine phosphatase receptor-type C polypeptide-associated protein遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来のLPAP遺伝子としては、配列番号7に示すポリヌクレオチドが知られており(GenBank Accession No. X81422)、

その取得方法についても Schraven, B. ら, J. Biol. Chem., 269, 29102-29111, 1994 に記載されるように公知である。

【0061】

本発明における Mip-1 β 遺伝子は small inducible cytokine A4 遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来の Mip-1 β 遺伝子としては、配列番号 8 に示すポリヌクレオチドが知られており (GenBank Accession No. J04130)、その取得方法についても Lipens, M. A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 9704-9708, 1988 に記載されるように公知である。

【0062】

本発明における L-セレクチン (selectin L) 遺伝子は公知の遺伝子である。例えばヒト由来の L-セレクチン遺伝子としては、配列番号 9 に示すポリヌクレオチドが知られており (GenBank Accession No. NM_000655)、その取得方法についても Siegelman, M. H. ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 5562-5566, 1989 に記載されるように公知である。

【0063】

本発明における EGFL6 遺伝子は epidermal growth factor-like 6 遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来の EGFL6 遺伝子としては、配列番号 10 に示すポリヌクレオチドが知られており (GenBank Accession No. NM_015507)、その取得方法についても Yeung, G. ら, Genomics, 62, 304-307, 1999 に記載されるように公知である。

【0064】

本発明における IDO 遺伝子は indoleamine 2, 3-dioxygenase 遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来の IDO 遺伝子としては、配列番号 11 に示すポリヌクレオチドが知られており (GenBank Accession No. NM_002164)、その取得方法についても Dai, W. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 168, 1-8, 1990 に記載されるように公知である。

【0065】

本発明における IL-8 遺伝子は interleukin 8 遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来の IL-8 遺伝子としては、配列番号 12 に示すポリヌクレオチドが知られており (GenBank Accession No. NM_000584)、その取得方法についても Schmid, J. ら, J. Immunol., 139, 250-256, 1987 に記載されるように公知である。

【0066】

本発明における CD11c 遺伝子は leukocyte surface antigen p150, 95 alpha subunit 遺伝子、もしくは integrin alpha-x 遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来の CD11c 遺伝子としては、配列番号 13 に示すポリヌクレオチドが知られており (GenBank Accession No. NM_000887)、その取得方法についても Corbi, A. L. ら, EMBO J., 6, 4023-4028, 1987 に記載されるように公知である。

【0067】

本発明における TLR2 遺伝子は toll-like receptor 2 遺伝子とも呼ばれる公知の遺伝子である。例えばヒト由来の TLR2 遺伝子としては、配列番号 14 に示すポリヌクレオチドが知られており (GenBank Accession No. U88878)、その取得方法についても Rock, F. L. ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 588-593, 1998 に記載されるよ

10

20

30

40

50

うに公知である。

【0068】

本発明は、前述するように、IBDに罹患した患者の大腸（結腸）組織において、正常大腸（結腸）組織に比して、FcyR IIIa遺伝子、FcyR IIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG III遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子、およびTLR2遺伝子が特異的に発現上昇しているという知見を発端に、これらの遺伝子発現の有無や発現の程度を検出することによって上記IBDの罹患の有無や罹患の程度が特異的に検出でき、該疾患の診断を正確に行うことができるという知見に基づくものである。

10

【0069】

上記ポリヌクレオチドは、従って、被験者における上記遺伝子の発現の有無またはその程度を検出することによって、該被験者がIBDに罹患しているか否かまたはその罹患の程度を診断することのできるツール（疾患マーカー）として有用である。

また上記ポリヌクレオチドは、後述の（3-1）項に記載するようなIBDの予防、改善または治療に有用な候補物質のスクリーニングにおいて、FcyR IIIa遺伝子、FcyR IIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG III遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子、またはTLR2遺伝子の発現変動を検出するためのスクリーニングツール（疾患マーカー）としても有用である。

20

【0070】

本発明の疾患マーカーは、前記FcyR IIIa遺伝子、FcyR IIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG III遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子、またはTLR2遺伝子の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び／またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなることを特徴とするものである。

【0071】

具体的には、本発明の疾患マーカーは、配列番号29に記載のFcyR IIIa遺伝子の塩基配列、配列番号1に記載のFcyR IIIb遺伝子の塩基配列、配列番号2に記載のMig遺伝子の塩基配列、配列番号3に記載のNRG-2遺伝子の塩基配列、配列番号4に記載のヘキソキナーゼ 3遺伝子の塩基配列、配列番号5に記載のHM74遺伝子の塩基配列、配列番号6に記載のREG III遺伝子の塩基配列、配列番号7に記載のLPAP遺伝子の塩基配列、配列番号8に記載のMip-1 β 遺伝子の塩基配列、配列番号9に記載のL-セレクチン遺伝子の塩基配列、配列番号10に記載のEGFL6遺伝子の塩基配列、配列番号11に記載のIDO遺伝子の塩基配列、配列番号12に記載のIL-8遺伝子の塩基配列、配列番号13に記載のCD11c遺伝子の塩基配列、または配列番号14に記載のTLR2遺伝子の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び／またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなるものを挙げることができる。

30

40

【0072】

ここで相補的なポリヌクレオチド（相補鎖、逆鎖）とは、前記FcyR IIIa遺伝子、FcyR IIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG III遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子、またはTLR2遺伝子の塩基配列からなるポリヌクレオチドの全長配列、または該塩基配列において少なくとも連続した15塩基長の塩基配列を有するその部分配列（ここでは便宜上、これらを「正鎖」ともいう）に対して、A：TおよびG：Cといった塩基対関係に基づいて、塩基的に相補的な関係にあるポリヌクレオチドを意味するものである

50

。ただし、かかる相補鎖は、対象とする正鎖の塩基配列と完全に相補配列を形成する場合に限らず、対象とする正鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる程度の相補関係を有するものであってもよい。なお、ここでストリンジェントな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に教示されるように、複合体或いはプローブを結合する核酸の融解温度 (T_m) に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件を挙げることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件として「0.1×SSC、0.1% SDS、65℃」程度の洗浄条件を挙げることができる。具体的には、このような相補鎖として、対象の正鎖の塩基配列と完全に相補的な関係にある塩基配列からなる鎖、並びに該鎖と少なくとも90%、好ましくは95%の相同性を有する塩基配列からなる鎖を例示することができる。

【0073】

ここで、正鎖側のポリヌクレオチドには、前記 FcyR IIIa 遺伝子、FcyR IIIb 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン 遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子、または TLR2 遺伝子の塩基配列、またはその部分配列を有するものだけでなく、上記相補鎖の塩基配列に対してさらに相補的な関係にある塩基配列からなる鎖を含めることができる。

【0074】

さらに上記正鎖のポリヌクレオチド及び相補鎖（逆鎖）のポリヌクレオチドは、各々一本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されても、また二本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されてもよい。

【0075】

本発明のIBDの疾患マーカーは、具体的には、前記 FcyR IIIa 遺伝子、FcyR IIIb 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン 遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子、または TLR2 遺伝子の塩基配列（全長配列）からなるポリヌクレオチドであってもよいし、その相補配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。またこれら本発明遺伝子もしくは該遺伝子に由来するポリヌクレオチドを選択的に（特異的に）認識するものであれば、上記全長配列またはその相補配列の部分配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。この場合、部分配列としては、上記全長配列またはその相補配列の塩基配列から任意に選択される少なくとも15個の連続した塩基長を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0076】

なお、ここで「選択的に（特異的に）認識する」とは、例えばノーザンブロット法においては、FcyR IIIa 遺伝子、FcyR IIIb 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン 遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子、TLR2 遺伝子、またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異的に検出できること、またRT-PCR法においては、FcyR IIIa 遺伝子、FcyR IIIb 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1β 遺伝子、L-セレクチン 遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子、TLR2 遺伝子、またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異

的に生成されることを意味するが、それに限定されことなく、当業者が上記検出物または生成物がこれらの遺伝子に由来するものであると判断できるものであればよい。

【0077】

本発明の疾患マーカーは、例えば配列番号29に記載のFcγRIIIa遺伝子の塩基配列、配列番号1に記載のFcγRIIIb遺伝子の塩基配列、配列番号2に記載のMig遺伝子の塩基配列、配列番号3に記載のNRG-2遺伝子の塩基配列、配列番号4に記載のヘキソキナーゼ3遺伝子の塩基配列、配列番号5に記載のHM74遺伝子の塩基配列、配列番号6に記載のREGIII遺伝子の塩基配列、配列番号7に記載のLPAP遺伝子の塩基配列、配列番号8に記載のMip-1β遺伝子の塩基配列、配列番号9に記載のL-セレクチン遺伝子の塩基配列、配列番号10に記載のEGFL6遺伝子の塩基配列、配列番号11に記載のIDO遺伝子の塩基配列、配列番号12に記載のIL-8遺伝子の塩基配列、配列番号13に記載のCD11c遺伝子の塩基配列、または配列番号14に記載のTLR2遺伝子の塩基配列をもとに、例えばprimer 3 (HYPERLINK <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) あるいはベクターNTI (Infomax社製)を利用して設計することができる。具体的には前記本発明遺伝子の塩基配列をprimer 3またはベクターNTIのソフトウェアにかけて得られる、プライマーまたはプローブの候補配列、若しくは少なくとも該配列を一部に含む配列をプライマーまたはプローブとして使用することができる。

10

【0078】

本発明の疾患マーカーは、上述するように連続する少なくとも15塩基の長さを有するものであればよいが、具体的にはマーカーの用途に応じて、長さを適宜選択し設定することができる。

20

【0079】

(1-2) プローブまたはプライマーとしてのポリヌクレオチド

本発明においてIBDの検出(診断)は、被験者の生体組織、特に大腸組織におけるFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子から選ばれるいずれかの遺伝子の発現の有無または発現レベル(発現量)を評価することによって行われる。この場合、上記本発明の疾患マーカーは、上記遺伝子の発現によって生じたRNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に認識し増幅するためのプライマーとして、または該RNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に検出するためのプローブとして利用することができる。

30

【0080】

本発明疾患マーカーをIBDの検出(遺伝子診断)においてプライマーとして用いる場合には、通常15bp~100bp、好ましくは15bp~50bp、より好ましくは15bp~35bpの塩基長を有するものが例示できる。また検出プローブとして用いる場合には、通常15bp~全配列の塩基数、好ましくは15bp~1kb、より好ましくは100bp~1kbの塩基長を有するものが例示できる。

40

【0081】

本発明の疾患マーカーは、ノーザンブロット法、RT-PCR法、in situハイブリダーゼーション法などといった、特定遺伝子の特異的に検出する公知の方法において、常法に従ってプライマーまたはプローブとして利用することができる。該利用によってIBDにおけるFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子またはTLR2遺伝子の発現の有無または発現レベル(発現量)を評価することができる。

50

測定対象試料としては、使用する検出方法の種類に応じて、被験者の大腸組織の一部をバイオプシ等で採取するか、若しくは腸管洗浄液等から回収し、そこから常法に従って調製した total RNAを用いてもよいし、さらに該RNAをもとにして調製される各種のポリヌクレオチドを用いてもよい。

【0082】

また、生体組織における本発明遺伝子の遺伝子発現レベルは、DNAチップを利用して検出あるいは定量することができる。この場合、本発明の疾患マーカーは当該DNAチップのプロープとして使用することができる（例えば、アフィメトリックス社の Gene Chip Human Genome U95 A, B, C, D, E の場合、25bpの長さのポリヌクレオチドプロープとして用いられる）。かかるDNAチップを、生体組織から採取したRNAをもとに調製される標識DNAまたはRNAとハイブリダイズさせ、該ハイブリダイズによって形成された上記プロープ（本発明疾患マーカー）と標識DNAまたはRNAとの複合体を、該標識DNAまたはRNAの標識を指標として検出することにより、生体組織中での本発明遺伝子の発現の有無または発現レベル（発現量）が評価できる。

10

【0083】

上記DNAチップは、本発明遺伝子のいずれかと結合し得る1種または2種以上の本発明疾患マーカーを含んでいれば良い。複数の疾患マーカーを含むDNAチップの利用によれば、ひとつの生体試料について、同時に複数の遺伝子の発現の有無または発現レベルの評価が可能である。

20

【0084】

本発明の疾患マーカーは、IBDの診断、検出（罹患の有無や罹患の程度の診断）に有用である。具体的には、該疾患マーカーを利用したIBDの診断は、被験者の大腸組織と正常者の大腸組織におけるFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの遺伝子の遺伝子発現レベルの違いを判定することによって行うことができる。この場合、遺伝子発現レベルの違いには、発現のある／なしの違いだけでなく、被験者の大腸組織と正常者の大腸組織の両者ともに発現がある場合でも、両者間の発現量の格差が2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。具体的にはFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子はIBDで発現誘導を示すので、被験者の大腸組織で発現しており、該発現量が正常者の大腸組織の発現量と比べて2倍以上、好ましくは3倍以上多ければ、被験者についてIBDの罹患が疑われる。

30

【0085】

(1-3) 抗体

本発明は、IBDの疾患マーカーとして、FcγRIIIa遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「FcγRIIIa」ともいう）、FcγRIIIb遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「FcγRIIIb」ともいう）、Mig遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「Mig」ともいう）、NRG-2遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「NRG-2」ともいう）、ヘキソキナーゼ3遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「ヘキソキナーゼ3」ともいう）、HM74遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「HM74」ともいう）、REGIII遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「REGIII」ともいう）、LPAP遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書においては「LPAP」ともいう）、Mip-1β遺伝子の発現産物（タンパク質）（これを本明細書において

40

50

は「M i p - 1 β 」ともいう)、L-セレクチン遺伝子の発現産物(タンパク質)(これを本明細書においては「L-セレクチン」ともいう)、E G F L 6 遺伝子の発現産物(タンパク質)(これを本明細書においては「E G F L 6」ともいう)、I D O 遺伝子の発現産物(タンパク質)(これを本明細書においては「I D O」ともいう)、I L - 8 遺伝子の発現産物(タンパク質)(これを本明細書においては「I L - 8」ともいう)、C D 1 1 c 遺伝子の発現産物(タンパク質)(これを本明細書においては「C D 1 1 c」ともいう)、またはT L R 2 遺伝子の発現産物(タンパク質)(これを本明細書においては「T L R 2」ともいう)を特異的に認識することのできる抗体を提供する。

【0086】

ここで、F c y R I I I a としては配列番号29に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、F c y R I I I b としては配列番号1に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、M i g としては配列番号2に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、N R G - 2 としては配列番号3に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、ヘキソキナーゼ 3 としては配列番号4に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、H M 7 4 としては配列番号5に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、R E G I I I としては配列番号6に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、L P A P としては配列番号7に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、M i p - 1 β としては配列番号8に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、L-セレクチンとしては配列番号9に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、E G F L 6 としては配列番号10に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、I D O としては配列番号11に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、I L - 8 としては配列番号12に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、C D 1 1 c としては配列番号13に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、T L R 2 としては配列番号14に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を挙げることができる。

【0087】

なお、配列番号29に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号30で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号1に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号15で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号2に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号16で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号3に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号17で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号4に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号18で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号5に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号19で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号6に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号20で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号7に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号21で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号8に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号22で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号9に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号23で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号10に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号24で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号11に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号25で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、配列番号12に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号26で示されるアミノ酸配列を

有するタンパク質を、配列番号13に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号27で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、そして配列番号14に示されるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の具体的様態としては配列番号28で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を例示することができる。

【0088】

なお、配列番号30に示すタンパク質はヒト由来のFcγRIIIa遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Peltz, G. A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 1013-1017, 1989)に記載されるように公知である。

10

【0089】

また配列番号15に示すタンパク質はヒト由来のFcγRIIIb遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Ravetch, J. V. ら, J. Exp. Med., 170, 481-497, 1989)に記載されるように公知である。

【0090】

また配列番号16に示すタンパク質はヒト由来のMig遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Farber, J. M. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 192, 223-230, 1993)に記載されるように公知である。

20

【0091】

また配列番号17に示すタンパク質はヒト由来のNRG-2遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Carraway, K. L. III ら, Nature, 387, 512-516, 1997)に記載されるように公知である。

【0092】

また配列番号18に示すタンパク質はヒト由来のヘキソキナーゼ3遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Furuta, H. ら, Genomics, 36, 206-209, 1996)に記載されるように公知である。

30

【0093】

また配列番号19に示すタンパク質はヒト由来のHM74遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Nomura, H. ら, Int. Immunol., 5, 1239-1249, 1993)に記載されるように公知である。

【0094】

また配列番号20に示すタンパク質はヒト由来のREGIII遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Duseti, N. J. ら, Genomics, 19, 108-114, 1994)に記載されるように公知である。

40

【0095】

また配列番号21に示すタンパク質はヒト由来のLPAP遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Schraven, B. ら, J. Biol. Chem., 269, 29102-29111, 1994)に記載されるように公知である。

【0096】

また配列番号22に示すタンパク質はヒト由来のMip-1β遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Lipes, M. A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 9704-9708, 1988)に記載されるように公知である。

50

【0097】

また配列番号23に示すタンパク質はヒト由来のL-セレクチン遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Siegelman, M. H. ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 5562-5566, 1989)に記載されるように公知である。

【0098】

また配列番号24に示すタンパク質はヒト由来のEGFL6遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Yeung, G. ら, Genomics, 62, 304-307, 1999)に記載されるように公知である。

10

【0099】

また配列番号25に示すタンパク質はヒト由来のIDO遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Dai, W. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 168, 1-8, 1990)に記載されるように公知である。

【0100】

また配列番号26に示すタンパク質はヒト由来のIL-8遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Schmid, J. ら, J. Immunol., 139, 250-256, 1987)に記載されるように公知である。

20

【0101】

また配列番号27に示すタンパク質はヒト由来のCD11c遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Corbi, A. L. ら, EMBO J., 6, 4023-4028, 1987)に記載されるように公知である。

【0102】

また配列番号28に示すタンパク質はヒト由来のTLR2遺伝子によってコードされる公知のタンパク質であり、その取得方法についても文献(Rock, F. L. ら, Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 588-593, 1998)に記載されるように公知である。

30

【0103】

本発明は、前述するように、IBDに罹患した患者の大腸(結腸)組織において、正常な大腸(結腸)組織に比して、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子が特異的に発現上昇しているという知見を発端に、これらの遺伝子の発現産物(タンパク質)の有無やその発現の程度を検出することによって上記IBDの罹患の有無や罹患の程度が特異的に検出でき、該疾患の診断を正確に行うことができるという発想に基づくものである。上記抗体は、従って、被験者における上記タンパク質の発現の有無またはその程度を検出することによって、該被験者がIBDに罹患しているか否かまたはその疾患の程度を診断することのできるツール(疾患マーカー)として有用である。また上記抗体は、後述の(3-2)項に記載するようなIBDの予防、改善または治療に有用な候補物質のスクリーニングにおいて、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現変動を検出するためのスクリーニングツール(疾患マーカー)としても有用である。

40

【0104】

本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、M

50

i p-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかを免疫抗原とするポリクローナル抗体であっても、またそのモノクローナル抗体であってもよい。さらにこれら本発明タンパク質のアミノ酸配列のうち少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体も、本発明の抗体に含まれる。

【0105】

これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる (Current Protocol in Molecular Biology, Chapter 11.12~11.13 (2000))。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製したFc γ R IIla、Fc γ R IIlb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2を用いて、あるいは常法に従ってこれら本発明タンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製したFc γ R IIla、Fc γ R IIlb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2、あるいはこれらタンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

【0106】

抗体の作製に免疫抗原として使用されるFc γ R IIla、Fc γ R IIlb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2は、本発明により提供される遺伝子の配列情報 (配列番号1~14, 29) に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法 (Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)) などに準じて行うことができる。

【0107】

具体的には、Fc γ R IIla、Fc γ R IIlb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2をコードする遺伝子が所望の宿主細胞中で発現できる組み換えDNA (発現ベクター) を作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養して、得られる培養物から、目的タンパク質を回収することによって、本発明抗体の製造のための免疫抗原としてのタンパク質を得ることができる。また、これらFc γ R IIla、Fc γ R IIlb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の部分ペプチドは、本発明により提供されるアミノ酸配列の情報 (配列番号15~28, 30) に従って、一般的な化学合成法 (ペプチド合成) によって製造することもできる。

【0108】

なお、本発明のFc γ R IIla、Fc γ R IIlb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1 β 、L-セレクチン、

EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2には、配列番号15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または30に示す各アミノ酸配列に関わるタンパク質のみならず、その相同物も包含される。該相同物としては、上記配列番号15～28及び30のいずれかで示されるアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ改変前の元のタンパク質と免疫学的に同等の活性を有するタンパク質を挙げることができる。

【0109】

ここで同等の免疫学的活性を有するタンパク質としては、適当な動物あるいはその細胞において特定の免疫反応を誘発し、かつFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2に対する抗体と特異的に結合する能力を有するタンパク質を挙げることができる。

【0110】

なお、タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その免疫学的活性が保持される限り制限はない。免疫学的活性を喪失することなくアミノ酸残基が、どのように、何個置換、挿入あるいは欠失されればよいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。また置換されるアミノ酸は、置換後に得られるタンパク質がFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2と同等の免疫学的活性を保持している限り、特に制限されないが、タンパク質の構造保持の観点から、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性並びに両親媒性など、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe及びTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn及びGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Asp及びGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、Arg及びHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらを指標として同群に属するアミノ酸を適宜選択することができる。

【0111】

本発明抗体は、また、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを用いて調製されるものであってよい。かかる抗体の製造のために用いられるオリゴ（ポリ）ペプチドは、機能的な生物活性を有することは要しないが、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2と同様な免疫原特性を有するものであることが望ましい。好ましくはこの免疫原特性を有し、且つFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2のアミノ酸配列において少なくとも連続する8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるオリゴ（ポリ）ペプチドを例示することができる。

【0112】

かかるオリゴ（ポリ）ペプチドに対する抗体の製造は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。限定はされないが、そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラ

10

20

30

40

50

ルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン及びジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG（カルメットーゲラン桿菌）やコリネバクテリウム・パルヴムなどのヒトアジュバントが含まれる。

【0113】

本発明の抗体は、FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2に特異的に結合する性質を有することから、該抗体を利用することによって、被験者の組織内に発現した上記タンパク質を特異的に検出することができる。すなわち、当該抗体は被験者の組織内におけるFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2のタンパク発現の有無を検出するためのプローブとして有用である。

10

【0114】

具体的には、患者の大腸組織の一部をバイオプシ等で採取、もしくは腸管洗浄液等から回収し、そこから常法に従ってタンパク質を調製して、例えばウェスタンブロット法、ELISA法など公知の検出方法において、上記抗体を常法に従ってプローブとして使用することによって、FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2を検出することができる。

20

【0115】

IBDの診断に際しては、被験者の大腸組織におけるFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれか少なくとも一つと正常な大腸組織におけるこれらのタンパク質との量の違いを判定すればよい。この場合、タンパク量の違いには、タンパクのある／なし、あるいはタンパク量の違いが2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。具体的には、FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2はIBDで発現誘導を示すので、被験者の大腸組織で該遺伝子の発現産物（FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c、TLR2）が存在しており、該量が正常な大腸組織の発現産物量と比べて2倍以上、好ましくは3倍以上多いことが判定されれば、IBDの罹患が疑われる。

30

【0116】

（2）IBDの検出方法（診断方法）

本発明は、前述した本発明疾患マーカーを利用したIBDの検出方法（診断方法）を提供するものである。

40

【0117】

具体的には、本発明の検出方法（診断方法）は、被験者の大腸組織の一部をバイオプシ等で採取するか、もしくは腸管洗浄液等から回収し、そこに含まれるIBDに関連するFcγR I I I a遺伝子、FcγR I I I b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG I I I遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの遺伝子発現レベル、およびこれらの遺伝子に由来するタンパク質（FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c、TLR2）の量

50

(レベル)を検出し、その発現量またはそのタンパク質量を測定することにより、IBDの罹患の有無またはその程度を診断するものである。また本発明の検出(診断)方法は、例えばIBD患者において、該疾患の改善のために治療薬を投与した場合における、該疾患の改善の有無またはその程度を検出(診断)することもできる。

【0118】

本発明の検出方法は次の(a)、(b)及び(c)の工程を含むものである：

(a) 被験者の生体試料と本発明の疾患マーカーを接触させる工程、

(b) 生体試料中のFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの遺伝子発現レベル、またはFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかのタンパク質量を、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、

(c) (b)の結果をもとに、IBDの罹患を判断する工程。

【0119】

ここで用いられる生体試料としては、被験者の生体組織(大腸組織及びその周辺組織など)から調製される試料を挙げることができる。具体的には、該組織から調製されるRNA含有試料、若しくはそれからさらに調製されるポリヌクレオチドを含む試料、または上記組織から調製されるタンパク質を含む試料を挙げることができる。かかるRNA、ポリヌクレオチドまたはタンパク質を含む試料は、被験者の大腸組織の一部をバイオプシ等で採取するか、もしくは腸管洗浄液等から回収し、そこから常法に従って調製することができる。

本発明の診断方法は、測定対象として用いる生体試料の種類に応じて、具体的には下記のようにして実施される。

【0120】

(2-1) 測定対象の生体試料としてRNAを利用する場合

測定対象物としてRNAを利用する場合、IBDの検出は、具体的に下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む方法によって実施することができる：

(a) 被験者の生体試料から調製されたRNAまたはそれから転写された相補的ポリヌクレオチドと、前記本発明の疾患マーカー(FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子またはTLR2遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチド及び/又は該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド)とを結合させる工程、

(b) 該疾患マーカーに結合した生体試料由来のRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、

(c) 上記(b)の測定結果に基づいて、IBDの罹患を判断する工程。

【0121】

測定対象物としてRNAを利用する場合は、本発明の検出方法(診断方法)は、該RNA中のFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現レベルを検出し、測定することによって実施される。具体的には、前述のポリヌクレオチドからなる本発明の疾患マーカー(FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺

伝子、I D O 遺伝子、I L - 8 遺伝子、C D 1 1 c 遺伝子または T L R 2 遺伝子の塩基配列において連続する少なくとも 1 5 塩基を有するポリヌクレオチド及び／又はその相補的なポリヌクレオチド) をプライマーまたはプローブとして用いて、ノーザンブロット法、R T - P C R 法、DNA チップ解析法、i n s i t u ハイブリダイゼーション解析法などの公知の方法を行うことにより実施できる。

【0122】

ノーザンブロット法を利用する場合は、本発明の上記疾患マーカーをプローブとして用いることによって、RNA 中の F c y R I I I a 遺伝子、F c y R I I I b 遺伝子、M i g 遺伝子、N R G - 2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、H M 7 4 遺伝子、R E G I I I 遺伝子、L P A P 遺伝子、M i p - 1 β 遺伝子、L - セレクチン遺伝子、E G F L 6 遺伝子、I D O 遺伝子、I L - 8 遺伝子、C D 1 1 c 遺伝子および T L R 2 遺伝子のいずれかの発現の有無やその発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、本発明の疾患マーカー（相補鎖）を放射性同位元素 (^{32}P 、 ^{33}P など: R I) や蛍光物質などで標識し、それを、常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーした被験者の生体組織由来の RNA とハイブリダイズさせた後、形成された疾患マーカー (DNA) と RNA との二重鎖を、疾患マーカーの標識物 (R I 若しくは蛍光物質) に由来するシグナルを放射線検出器 (B A S - 1 8 0 0 I I、富士フイルム社製) または蛍光検出器で検出、測定する方法を例示することができる。また、A l k P h o s D i r e c t L a b e l l i n g a n d D e t e c t i o n S y s t e m (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) を用いて、該プロトコルに従って疾患マーカー (プローブ DNA) を標識し、被験者の生体組織由来の RNA とハイブリダイズさせた後、疾患マーカーの標識物に由来するシグナルをマルチバイオイメージャー S T O R M 8 6 0 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) で検出、測定する方法を使用することもできる。

【0123】

R T - P C R 法を利用する場合は、本発明の上記疾患マーカーをプライマーとして用いることによって、RNA 中の F c y R I I I a 遺伝子、F c y R I I I b 遺伝子、M i g 遺伝子、N R G - 2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、H M 7 4 遺伝子、R E G I I I 遺伝子、L P A P 遺伝子、M i p - 1 β 遺伝子、L - セレクチン遺伝子、E G F L 6 遺伝子、I D O 遺伝子、I L - 8 遺伝子、C D 1 1 c 遺伝子および T L R 2 遺伝子のいずれかの発現の有無や発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、被験者の生体組織由来の RNA から常法に従って c D N A を調製して、これを鋳型として標的の F c y R I I I a 遺伝子、F c y R I I I b 遺伝子、M i g 遺伝子、N R G - 2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、H M 7 4 遺伝子、R E G I I I 遺伝子、L P A P 遺伝子、M i p - 1 β 遺伝子、L - セレクチン遺伝子、E G F L 6 遺伝子、I D O 遺伝子、I L - 8 遺伝子、C D 1 1 c 遺伝子または T L R 2 遺伝子の領域が増幅できるように、本発明の疾患マーカーから調製した一対のプライマー (上記 c D N A (一鎖) に結合する正鎖、+ 鎖に結合する逆鎖) をこれとハイブリダイズさせて、常法に従って P C R 法を行い、得られた増幅二本鎖 DNA を検出する方法を例示することができる。なお、増幅された二本鎖 DNA の検出は、上記 P C R を予め R I や蛍光物質で標識しておいたプライマーを用いて行うことによって産生される標識二本鎖 DNA を検出する方法、産生された二本鎖 DNA を常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーさせて、標識した疾患マーカーをプローブとして使用してこれとハイブリダイズさせて検出する方法などを用いることができる。なお、生成された標識二本鎖 DNA 産物はアジレント 2 1 0 0 バイオアナライザ (横河アナリティカルシステムズ社製) などで測定することができる。また、S Y B R G r e e n R T - P C R R e a g e n t s (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社製) で該プロトコルに従って R T - P C R 反応液を調製し、A B I P R I S M 7 7 0 0 S e q u e n c e D e t e c t i o n S y s t e m (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社製) で反応させて、該反応物を検出することもできる。

【0124】

DNAチップ解析を利用する場合は、本発明の上記疾患マーカーをDNAプローブ（1本鎖または2本鎖）として貼り付けたDNAチップを用意し、これに被験者の生体組織由来のRNAから常法によって調製されたcRNAとハイブリダイズさせて、形成されたDNAとcRNAとの二本鎖を、本発明の疾患マーカーから調製される標識プローブと結合させて検出する方法を挙げることができる。また、上記DNAチップとして、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの遺伝子発現レベルの検出、測定が可能なDNAチップを用いることもできる。かかる遺伝子の発現レベルを検出、測定することができるDNAチップとしては、Affymetrix社のGene Chip Human Genome U95 A, B, C, D, Eを挙げることができる。かかるDNAチップを用いた、被験者RNA中のFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの遺伝子発現レベルの検出、測定については、実施例において詳細に説明する。

10

【0125】

(2-2) 測定対象の生体試料としてタンパク質を用いる場合

20

測定対象物としてタンパク質を用いる場合は、本発明のIBDの検出方法（診断方法）は、生体試料中のFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかを検出し、その量を測定することによって実施される。具体的には下記の工程（a）、（b）及び（c）を含む方法によって実施することができる：

（a）被験者の生体試料から調製されたタンパク質と抗体に関する本発明の疾患マーカー（FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2を認識する抗体）とを結合させる工程、

30

（b）該疾患マーカーに結合した生体試料由来のタンパク質を、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、

（c）上記（b）の測定結果に基づいて、IBDの罹患を判断する工程。

【0126】

より具体的には、本発明の疾患マーカーとして抗体（FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2を認識する抗体）を用いて、ウエスタンブロット法などの公知方法で、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかを検出、定量する方法を挙げることができる。

40

【0127】

ウエスタンブロット法は、一次抗体として本発明疾患マーカーを用いた後、二次抗体として¹²⁵Iなどの放射性同位元素、蛍光物質、ホースラディッシュペルオキシターゼ（HRP）などの酵素等で標識した標識抗体（一次抗体に結合する抗体）を用い、得られる標識化合物の放射性同位元素、蛍光物質などに由来するシグナルを放射線測定器（BAS-1800II：富士フイルム社製など）、蛍光検出器などで検出し、測定することによって実施できる。また、一次抗体として本発明疾患マーカーを用いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System（アマシャム

50

ファルマシアバイオテック社製)を用いて、該プロトコールに従って検出し、マルチバイオイメージャーSTORM 860 (アマシャム ファルマシアバイオテック社製)で測定することもできる。

【0128】

なお、上記において測定対象とするFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2の機能または活性は、既に知られており、該タンパク質の量と機能乃至活性とは一定の相関関係を有している。従って、上記タンパク質の量の測定に代えて、該タンパク質の機能または活性の測定を行うことによって、本発明のIBDの検出(診断)を実施することができる。すなわち本発明は、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の公知の機能または活性を指標として、これを公知の方法(具体的には後述の(3-3)項を参照)に従って測定、評価することからなる、IBDの検出(診断)方法をも包含する。

【0129】

(2-3) IBDの診断

IBDの診断は、例えば、被験者の大腸組織におけるFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG III遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの遺伝子発現レベル、もしくはこれらの遺伝子の発現産物であるタンパク質(FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c、TLR2)の量、機能若しくは活性(以下これらを合わせて「タンパク質レベル」ということがある)を、正常な大腸組織における当該遺伝子発現レベルまたは当該タンパク質レベルと比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。

【0130】

この場合、正常な大腸組織から採取調製した生体試料(RNAまたはタンパク質を含む試料)が必要であるが、これらはIBDに罹患していない人の大腸組織をバイオプシ等で採取するか、もしくは腸管洗浄液等から回収することによって取得することができる。なお、ここでいう「IBDに罹患していない人」とは、少なくともIBDの自覚症状がなく、好ましくは他の検査方法、例えば内視鏡検査や、注腸X線検査、消化管の生検などの結果、IBDでないと診断された人をいう。なお、当該「IBDに罹患していない人」を以下、本明細書では単に正常者という場合もある。

【0131】

被験者の大腸組織と正常な大腸組織(IBDに罹患していない人の大腸組織)との遺伝子発現レベルまたはタンパク質の量(レベル)の比較は、被験者の生体試料と正常者の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数(少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上)の正常な大腸組織を用いて均一な測定条件で測定して得られたFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG III遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの遺伝子発現レベル、若しくはこれらの遺伝子の発現産物であるタンパク質(FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c、TLR2)の量(レベル)の平均値または統計的中間値を、正常者の遺伝子発現レベル若しくはタンパク質の量として、比較に用いることがで

きる。

【0132】

被験者が、IBDであるかどうかの判断は、該被験者の大腸組織におけるFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの遺伝子発現レベル、またはその発現産物であるタンパク質（FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c、TLR2）の量（レベル）が、正常者のそれらのレベルと比較して2倍以上、好ましくは3倍以上多いことを指標として行うことができる。また、被験者の上記遺伝子発現レベルまたはタンパク質レベルが、いかなる正常者のそれらのレベルに比べて多ければ、該被験者はIBDであると判断できるか、該疾患の罹患が疑われる。

10

【0133】

(3) 候補薬のスクリーニング方法

(3-1) 遺伝子発現レベルを指標とするスクリーニング方法

本発明は、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現を抑制する物質のスクリーニング方法を提供する。

20

【0134】

本発明のスクリーニング方法は次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質とFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかを発現可能な細胞とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた細胞におけるFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞における上記に対応する遺伝子の発現量と比較する工程、

30

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

40

【0135】

かかるスクリーニングに用いられる細胞としては、内在性および外来性を問わず、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかを発現する培養細胞全般を挙げることができる。培養細胞においてこれら本発明遺伝子が発現しているか否かは、公知のノーザンブロット法やRT-PCR法にてこれらの遺伝子発現を検出することにより、容易に確認することができる。

【0136】

50

当該スクリーニングに用いられる細胞の具体例としては、例えば以下の(1)～(3)：
(1) IBDの動物モデルより単離、調製した腸管組織やリンパ系組織由来の細胞、
(2) 種々の刺激剤で処理又は未処理の腸管組織やリンパ系組織由来の細胞、
(3) 本発明遺伝子のいずれかを導入した細胞、
等を挙げることができる。

【0137】

ここで前記(1)の動物モデルとしては、IBDの動物モデルとして周知である如何なる動物モデルをも用いることができ、具体的には、(1)自然発症IBDモデル(C3H/HeJ Birマウス、Cotton top tamarins等)、(2)化学物質誘発モデル(ジニトロクロロベンゼン誘発モデル(ラット)、酢酸モデル(ラット)、トリニトロスルホン酸誘発モデル(マウス、ラット、ウサギ)、デキストラン硫酸誘発モデル(マウス、ラット、ハムスター)、カラゲナン誘発モデル(ラット、モルモット)、インドメタシン誘発モデル(ラット)等)、(3)トランスジェニック、ミュータント(IL-2ノックアウトマウス、IL-10ノックアウトマウス、TCRノックアウトマウス等)、または(4)移入モデル(CD45RBhi移入SCIDマウス等)を挙げることができる。

10

また前記(1)の腸管組織由来の細胞としては、好ましくは大腸(結腸)由来の初代培養細胞が挙げられる。

【0138】

前記(2)の腸管組織由来の細胞としては、好ましくは大腸(結腸)由来の株化細胞が挙げられ、具体的にはCaco-2細胞(ヒト結腸腺癌由来、ATTC株番号HTB-37)、HT-29細胞(ヒト結腸腺癌由来、ATTC株番号HTB-38)またはCOLO 205細胞(ヒト結腸腺癌由来、ATTC株番号CCL-222)等を挙げることができる。また前記(2)のリンパ系組織由来の細胞としては、好ましくはリンパ球、単球、マクロファージ、好中球または好酸球が挙げられる。また株化細胞としてRAW 264.7細胞(マウス単球由来、ATTC株番号TIB-71)、U-937細胞(ヒト組織球性リンパ腫由来、ATTC株番号CRL-1593.2)、THP-1細胞(ヒト単球由来、ATTC株番号TIB-202)またはJurkat細胞(ヒトT細胞リンパ腫由来、ATTC株番号TIB-152)等を挙げることができる。

20

前記(2)において刺激剤とは、リポポリサッカライド(Lipopolysaccharide : LPS)、ホルボールエステル(PMA等)、カルシウムイオノフォア、サイトカイン(IL-1、IL-6、IL-12、IL-18、TNF α 、IFN γ 等)等を挙げることができる。これら刺激剤で刺激することにより、細胞は炎症部位の環境により近い活性化状態になることが知られている。

30

【0139】

前記(3)の遺伝子導入細胞としては、前記(1)及び(2)に挙げた細胞の他、通常遺伝子導入に用いられる宿主細胞、すなわちCOP、L、C127、Sp2/O、NS-1、NIH3T3、ST2等のマウス由来細胞、ラット由来細胞、BHK、CHO等のハムスター由来細胞、COS1、COS3、COS7、CV1、Vero等のサル由来細胞、HeLa、293等のヒト由来細胞、およびSf9、Sf21、High Five等の昆虫由来細胞などが例示される。

40

さらに、本発明のスクリーニング方法に用いられる細胞には、細胞の集合体である組織なども含まれる。

【0140】

本発明スクリーニング方法によってスクリーニングされる被験物質(候補物質)は、制限されないが、核酸(本発明遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含む)、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明スクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料(被験試料)を上記細胞および/または組織と接触させることにより行われる。かかる被験試料としては、被験物質を含む細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げら

50

れるが、これらに制限されない。

【0141】

また本発明スクリーニングに際して、被験物質と細胞とを接触させる条件は、特に制限されないが、該細胞が死滅せず且つ本発明遺伝子を発現できる培養条件（温度、pH、培地組成など）を選択するのが好ましい。

【0142】

実施例に示すように、IBDに罹患した患者の大腸（結腸）組織では、正常な大腸（結腸）組織に比して、特異的にFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子が発現上昇している。この知見から、これら本発明遺伝子の発現亢進はIBDと関連していると考えられる。よって本発明のスクリーニング方法には、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現レベルを指標として、その発現を抑制する物質（発現レベルを正常レベルに戻す物質）を探索する方法が包含される。このスクリーニング方法によって、IBDの緩和／抑制作用を有する（IBDに対して改善／治療効果を発揮する）候補物質を提供することができる。

すなわち本発明のスクリーニング方法は、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現を抑制する物質を探索することによって、IBDの改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質を提供するものである。

【0143】

候補物質の選別は、具体的にはFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかが発現している細胞を用いる場合は、被験物質（候補物質）を添加した細胞における前記本発明遺伝子の発現レベルが、被験物質（候補物質）を添加しない細胞のそのレベルに比して低くなることをもって、行うことができる。また、これらFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現に発現誘導物質を必要とする細胞を用いる場合は、発現誘導物質（例えばリポポリサッカライド（Lipopolysaccharide: LPS）、ホルボールエステル（PMA等）、カルシウムイオノフォア等）によって誘導される発現が被験物質の存在によって抑制されること、すなわち発現誘導物質の存在下で被験物質を接触させた細胞の遺伝子発現が、発現誘導物質存在下で被験物質を接触させなかった対照細胞（正のコントロール）に比して低くなることを指標として、当該被験物質を候補物質として選別することができる。

【0144】

より具体的には、例えば結腸由来細胞であるCaco-2細胞、HT-29細胞またはCLO205細胞等の細胞を用いてIBDの改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質をスクリーニングするには、被験物質を加えない細胞（対照細胞）と、被験物質を加えた細胞とで、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子

、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子のいずれかの発現レベルを比較し、その発現レベルの減少を指標として候補物質を選別することができる。また、リポポリサッカライド (Lipopolysaccharide: LPS)、ホルボールエステル (PMA 等)、カルシウムイオノフォア、サイトカイン (IL-1、IL-6、IL-12、IL-18、TNF α 、IFN γ 等) などの刺激剤を添加した細胞 (対照細胞) と、刺激剤と被験物質とを同時に加えた細胞とで、Fc γ R IIIa 遺伝子、Fc γ R IIIb 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子のいずれかの発現レベルを比較し、その発現レベルの減少を指標として候補物質を選別することができる。また、前記刺激剤を添加して、既にFc γ R IIIa 遺伝子、Fc γ R IIIb 遺伝子、Mig 遺伝子、NRG-2 遺伝子、ヘキソキナーゼ 3 遺伝子、HM74 遺伝子、REG III 遺伝子、LPAP 遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6 遺伝子、IDO 遺伝子、IL-8 遺伝子、CD11c 遺伝子およびTLR2 遺伝子のいずれかが発現誘導された状態の細胞に被験物質を添加し、被験物質を添加しない対照細胞とで、前記本発明遺伝子の発現レベルを比較して、その発現レベルの低下を指標として候補物質を選別することもできる。

【0145】

ここでMigに関しては、IFN γ を添加したマクロファージ (対照細胞) と、IFN γ と被験物質とを同時に加えたマクロファージとで、当該Mig 遺伝子の発現レベルを比較し、その発現レベルの減少を指標として候補物質を選別することができる。また、IFN γ を添加して、既にMig 遺伝子が発現誘導された状態のマクロファージに被験物質を添加し、被験物質を添加しない対照細胞とで、当該Mig 遺伝子の発現レベルを比較して、その発現レベルの低下を指標として候補物質を選別することもできる (Liao, F. ら, J. Exp. Med., 182, 1301-1314, 1995)。

【0146】

またMip-1 β に関しては、ピコリン酸 (PA) 若しくはリポポリサッカライド (LPS) を添加した単球 (対照細胞) と、PA若しくはLPSと被験物質とを同時に加えた単球とで、当該Mip-1 β 遺伝子の発現レベルを比較し、その発現レベルの減少を指標として候補物質を選別することができる。また、PA若しくはLPSを添加して、既にMip-1 β 遺伝子が発現誘導された状態の単球に被験物質を添加し、被験物質を添加しない対照細胞とで、当該Mip-1 β 遺伝子の発現レベルを比較して、その発現レベルの低下を指標として候補物質を選別することもできる (Bosco, M. C. J. ら, J. Immunol., 164, 3283-3291, 2000)。

【0147】

またIDOに関しては、IFN γ を添加したマクロファージ (対照細胞) と、IFN γ と被験物質とを同時に加えたマクロファージとで、当該IDO 遺伝子の発現レベルを比較し、その発現レベルの減少を指標として候補物質を選別することができる。また、IFN γ を添加して、既にIDO 遺伝子が発現誘導された状態のマクロファージに被験物質を添加し、被験物質を添加しない対照細胞とで、当該IDO 遺伝子の発現レベルを比較して、その発現レベルの低下を指標として候補物質を選別することもできる (Carlin, J. M. ら, J. Interferon Res., 9, 329-337, 1989、もしくは繊維芽細胞を用いた方法として、Dai, W. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 168, 1-8, 1990)。

【0148】

このような本発明のスクリーニング方法における遺伝子発現レベルの検出及び定量は、前記細胞から調製したRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドと本発明の疾患マーカーとを用いて、前記 (2-1) 項に記述したように、ノーザンブロット法

、R T - P C R法など公知の方法、あるいはD N Aチップを利用する方法に従って実施できる。指標とする遺伝子発現レベルの低下（抑制、減少）の程度は、被験物質（候補物質）を接触させた細胞におけるF c y R I I I a遺伝子、F c y R I I I b遺伝子、M i g遺伝子、N R G - 2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、H M 7 4遺伝子、R E G I I I遺伝子、L P A P遺伝子、M i p - 1 β 遺伝子、L - セレクチン遺伝子、E G F L 6遺伝子、I D O遺伝子、I L - 8遺伝子、C D 1 1 c遺伝子およびT L R 2遺伝子のいずれかの発現が、被験物質（候補物質）を接触させない対照細胞における発現量と比較して10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上の低下（抑制、減少）を例示することができる。

【0149】

またF c y R I I I a遺伝子、F c y R I I I b遺伝子、M i g遺伝子、N R G - 2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、H M 7 4遺伝子、R E G I I I遺伝子、L P A P遺伝子、M i p - 1 β 遺伝子、L - セレクチン遺伝子、E G F L 6遺伝子、I D O遺伝子、I L - 8遺伝子、C D 1 1 c遺伝子およびT L R 2遺伝子のいずれかの発現レベルの検出及び定量は、これら本発明遺伝子の発現を制御する遺伝子領域（発現制御領域）に、例えばルシフェラーゼ遺伝子などのマーカー遺伝子をつないだ融合遺伝子を導入した細胞株を用いて、マーカー遺伝子由来のタンパク質の活性を測定することによっても実施できる。本発明のF c y R I I I a遺伝子、F c y R I I I b遺伝子、M i g遺伝子、N R G - 2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、H M 7 4遺伝子、R E G I I I遺伝子、L P A P遺伝子、M i p - 1 β 遺伝子、L - セレクチン遺伝子、E G F L 6遺伝子、I D O遺伝子、I L - 8遺伝子、C D 1 1 c遺伝子およびT L R 2遺伝子のいずれかの発現抑制物質のスクリーニング方法には、かかるマーカー遺伝子の発現量を指標として標的物質を探索する方法も包含されるものであり、この意味において、請求項9に記載する「F c y R I I I a遺伝子、F c y R I I I b遺伝子、M i g遺伝子、N R G - 2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、H M 7 4遺伝子、R E G I I I遺伝子、L P A P遺伝子、M i p - 1 β 遺伝子、L - セレクチン遺伝子、E G F L 6遺伝子、I D O遺伝子、I L - 8遺伝子、C D 1 1 c遺伝子、T L R 2遺伝子」の概念には、これら本発明遺伝子の発現制御領域とマーカー遺伝子との融合遺伝子が含まれる。

【0150】

なお、上記マーカー遺伝子としては、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子が好ましい。具体的には、上記のルシフェラーゼ遺伝子のほか、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β グルクロニダーゼ遺伝子、 β ガラクトシダーゼ遺伝子、及びエクオリン遺伝子などのレポーター遺伝子が例示できる。

また、ここで前記本発明遺伝子の発現制御領域は、例えば該遺伝子の転写開始部位上流約1 kb、好ましくは約2 kbを用いることができる。

【0151】

本発明遺伝子の発現制御領域は、例えば(i) 5' - R A C E法（例えば、5' f u l l R a c e C o r e K i t（宝酒造社製）等を用いて実施される）、オリゴキャップ法、S 1プライマーマッピング等の通常の方法により、5' 末端を決定するステップ；(ii) G e n o m e W a l k e r K i t（クローンテック社製）等を用いて5' - 上流領域を取得し、得られた上流領域について、プロモーター活性を測定するステップ；を含む手法等により同定することができる。また融合遺伝子の作成、およびマーカー遺伝子由来の活性測定は公知の方法で行うことができる。

【0152】

本発明のスクリーニング方法により選別される物質は、F c y R I I I a遺伝子、F c y R I I I b遺伝子、M i g遺伝子、N R G - 2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、H M 7 4遺伝子、R E G I I I遺伝子、L P A P遺伝子、M i p - 1 β 遺伝子、L - セレクチン遺伝子、E G F L 6遺伝子、I D O遺伝子、I L - 8遺伝子、C D 1 1 c遺伝子およびT L R 2遺伝子の少なくとも一種の遺伝子の遺伝子発現抑制剤として位置づけるこ

とができる。これらの物質が有する本発明遺伝子に対する発現抑制作用は、大腸組織障害の抑制に深く関わっているものと考えられる。よってこれらの物質は、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する薬物の有力な候補物質となる。

【0153】

（３－２）タンパク質の発現量を指標とするスクリーニング方法

本発明は、FcγR I I I a（FcγR I I I aタンパク質）、FcγR I I I b（FcγR I I I bタンパク質）、Mig（Migタンパク質）、NRG-2（NRG-2タンパク質）、ヘキソキナーゼ 3（ヘキソキナーゼ 3タンパク質）、HM74（HM74タンパク質）、REG I I I（REG I I Iタンパク質）、LPAP（LPAPタンパク質）、Mip-1β（Mip-1βタンパク質）、L-セレクチン（L-セレクチンタンパク質）、EGFL6（EGFL6タンパク質）、IDO（IDOタンパク質）、IL-8（IL-8タンパク質）、CD11c（CD11cタンパク質）、およびTLR2（TLR2タンパク質）のいずれかの発現を抑制する（減少させる）物質をスクリーニングする方法を提供する。

本発明スクリーニング方法は、次の工程（a）、（b）および（c）を含む：

【0154】

（a）被験物質とFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかを発現可能な細胞とを接触させる工程、

（b）被験物質を接触させた細胞における FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞における上記に対応するタンパク質の発現量と比較する工程、

（c）上記（b）の比較結果に基づいて、FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【0155】

本発明スクリーニングに用いられる細胞は、内在性および外来性を問わず、FcγR I I I a遺伝子、FcγR I I I b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REG I I I遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかを発現し、発現産物としてのFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかを有する培養細胞全般を挙げることができる。ここでFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11c、TLR2の発現は、遺伝子産物であるタンパク質を公知のウェスタン法にて検出することにより、容易に確認することができる。該細胞としては、具体的には、前記（３－１）項の（１）～（３）に記載したような、IBDの動物モデルより単離、調製した腸管組織やリンパ系組織由来の初代培養細胞、種々の刺激剤で処理した腸管組織やリンパ系組織由来の初代培養細胞若しくは株化細胞、または本発明遺伝子のいずれかを導入した株化細胞などが挙げられる。また当該細胞の範疇には、その細胞膜画分、細胞質画分、細胞核画分なども含まれる。

【0156】

本発明スクリーニング方法によってスクリーニングされる被験物質（候補物質）は、制限されないが、核酸（本発明遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含む）、ペプチド、タン

パク質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明スクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料（被験試料）を上記細胞や細胞膜画分と接触させることにより行われる。かかる被験試料としては、被験物質を含む細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0157】

実施例に示すように、IBDに罹患した患者の大腸（結腸）組織では、正常な大腸（結腸）組織に比して、特異的にFcγR I I I a遺伝子、FcγR I I I b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG I I I 10 遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子が発現上昇している。この知見から、これら本発明遺伝子の発現産物（タンパク質）の発現亢進はIBDと関連していると考えられる。よって本発明のスクリーニング方法には、これらFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかのタンパク発現レベルを指標として、その発現量を低下させる物質（発現レベルを正常レベルに戻す物質）を探索する方法が包含される。このスクリーニング方法によって、IBDの緩和／抑制作用を有する（IBDに対して改善／治療効果を発揮する）候補物質を提供することができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現量を低下させる物質を探索することによって、IBDの改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質を提供するものである。

【0158】

候補物質の選別は、具体的にはFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかを発現産生している細胞を用いる場合は、被験物質（候補物質）を添加した細胞における前記本発明タンパク質のタンパク量（レベル）が、被験物質（候補物質）を添加しない細胞のその量（レベル）に比して低くなることを指標として、行うことができる。また、これらFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現産生に発現誘導物質を必要とする細胞を用いる場合は、発現誘導物質（例えばリポポリサッカライド（Lipopolysaccharide: LPS）、ホルボールエステル（PMA等）、カルシウムイオノフォア、サイトカイン（IL-1、IL-6、IL-12、IL-18、TNFα、IFNγ等）等）によって誘導される当該タンパクの産生が被験物質の存在によって抑制されること、すなわち発現誘導物質の存在下で被験物質を接触させた細胞の遺伝子発現が、発現誘導物質存在下で被験物質を接触させなかった対照細胞（正のコントロール）に比して低くなることを指標として、当該被験物質を候補物質として選別することができる。

【0159】

より具体的には、例えば結腸由来細胞であるCaco-2細胞、HT-29細胞またはC₂O₂細胞等の細胞を用いてIBDの改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質をスクリーニングするには、被験物質を加えない細胞（対照細胞）と、被験物質を加えた細胞とで、FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかのタンパク質の量（レベル）を比較し、その量（レベル）の減少を指標として候補物質を選別することが

できる。また、リポポリサッカライド (Lipopolysaccharide: LPS)、ホルボールエステル (PMA等)、カルシウムイオノフォア、サイトカイン (IL-1、IL-6、IL-12、IL-18、TNF等)などの刺激剤を添加した細胞 (対照細胞)と、刺激剤と被験物質とを同時に加えた細胞とで、FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかのタンパク質の量 (レベル)を比較し、その量 (レベル)の低下を指標として候補物質を選別することができる。また、前記刺激剤を添加して、既にFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかが産生された状態の細胞に被験物質を添加し、被験物質を添加しない対照細胞とで、前記本発明タンパク質の量 (レベル)を比較して、その量 (レベル)の低下を指標として候補物質を選別することもできる。

【0160】

本発明のスクリーニング方法にかかるFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの産生量は、前述したように、例えば抗体に関する本発明疾患マーカー (例えばヒトFcγR I I I aタンパク質またはそのホモログ、ヒトFcγR I I I bタンパク質またはそのホモログ、ヒトMigタンパク質またはそのホモログ、ヒトNRG-2タンパク質またはそのホモログ、ヒトヘキソキナーゼ 3タンパク質またはそのホモログ、ヒトHM74タンパク質またはそのホモログ、ヒトREG I I Iタンパク質またはそのホモログ、ヒトLPAPタンパク質またはそのホモログ、ヒトMip-1βタンパク質またはそのホモログ、ヒトL-セレクチンタンパク質またはそのホモログ、ヒトEGFL6タンパク質またはそのホモログ、ヒトIDOタンパク質またはそのホモログ、ヒトIL-8タンパク質またはそのホモログ、ヒトCD11cタンパク質またはそのホモログ、ヒトTLR2タンパク質またはそのホモログを認識する抗体)を用いたウエスタンブロット法などの公知方法に従って定量できる。ウエスタンブロット法は、一次抗体として本発明疾患マーカーを用いた後、二次抗体として¹²⁵Iなどの放射性同位元素、蛍光物質、ホースラディッシュペルオキシターゼ (HRP)などの酵素等で標識した一次抗体に結合する抗体を用いて標識し、これら標識物質由来のシグナルを放射線測定器 (BAS-1800II:富士フイルム社製など)、蛍光検出器などで測定することによって実施できる。また、一次抗体として本発明疾患マーカーを用いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System (アマシャム ファルマシアバイオテック社製)を利用して、該プロトコールに従って検出し、マルチバイオイメージャーSTORM860 (アマシャム ファルマシアバイオテック社製)で測定することもできる。

【0161】

(3-3) タンパク質の機能 (活性)を指標とするスクリーニング方法

本発明は、FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能 (活性)を抑制する物質をスクリーニングする方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法は次の工程 (a)、(b)及び(c)を含む:

【0162】

(a) 被験物質を FcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2に接触させる工程、

(b) 上記 (a)の工程に起因して生じるFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の

機能または活性を測定し、該機能または活性を被験物質を接触させない場合のFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能または活性と比較する工程、

(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能または活性の低下をもたらす被験物質を選択する工程。

【0163】

本発明のスクリーニング方法においては、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の公知の機能・活性に基づく如何なる機能・活性測定方法をも利用することができる。すなわち、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の公知の機能・活性測定系に被験物質を添加し、当該FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の公知の機能・活性を抑制・阻害する被験物質を、IBDに対して改善／治療効果を有する候補物質として選択するスクリーニング方法であれば、本発明のスクリーニング方法の範疇に含まれる。

【0164】

前記本発明のスクリーニングは、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2を含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分と、被験物質とを接触させることにより行うことができる。

【0165】

ここでFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2を含む水溶液としては、例えばFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2を含む通常の水溶液の他、これらのタンパク質を含む細胞溶解液、細胞破碎液、核抽出液あるいは細胞の培養上清などを例示することができる。

【0166】

また、本発明のスクリーニング方法に用いられる細胞としては、内在性及び外来性を問わず、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクトリン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2を発現し得る細胞を挙げることができる。該細胞としては、具体的には、前記(3-1)項の(1)～(3)に記載したような、IBDの動物モデルより単離、調製したリンパ系組織や腸管組織由来の初代培養細胞、種々の刺激剤で処理したリンパ系組織や腸管組織由来の初代培養細胞若しくは株化細胞、または本発明遺伝子のいずれかを導入した株化細胞などを用いることができる。また本発明のスクリーニング方法に用いられる細胞画分とは、上記細胞に由来する各種の画分を意味し、これには、例えば細胞膜画分、細胞質画分、細胞核画分などが含まれる。

【0167】

前記スクリーニングにおいて用いられるFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β

1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2は、いずれも公知のタンパク質であり、前記(1-3)に記述したように、本発明により提供される遺伝子の配列情報(配列番号1~14, 29)に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換細胞の培養、および必要に応じて培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, D.M. Glover, IRL PRESS (1985))などに準じて行うことができる。

【0168】

実施例に示すように、IBDに罹患した患者の大腸(結腸)組織では、正常な大腸(結腸)組織に比して、特異的にFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REG III遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子が発現上昇している。この知見から、これらの遺伝子の発現産物(タンパク質)の機能(活性)亢進は、IBDと関連していると考えられる。よって本発明のスクリーニング方法には、これらFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能(活性)を指標として、該タンパク質の機能(活性)を抑制する物質を探索する方法が包含される。本発明スクリーニング方法によれば、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能または活性を抑制する物質を探索でき、かくしてIBDの緩和/抑制作用を有する(IBDに対して改善/治療効果を発揮する)候補物質が提供される。

【0169】

すなわち本発明のスクリーニング方法は、FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能または活性を抑制する物質を探索することによって、IBDの改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質を提供するものである。

【0170】

本発明スクリーニング方法によってスクリーニングされる被験物質(候補物質)は、制限されないが、核酸、ペプチド、蛋白質(FcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REG III、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2に対する抗体を含む)、有機化合物、無機化合物などであり、本発明スクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料(被験試料)を上記水溶液、細胞または細胞画分と接触させることにより行われる。被験試料としては、被験物質を含む、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0171】

本発明の各タンパク質の機能または活性に基づくスクリーニング方法のうち、共通のアクセシ法に基づくスクリーニング方法については、以下の「I. 受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング」、および「II. GPCR活性に基づくスクリーニング」の項に記述する。また本発明の各タンパク質の個々のスクリーニング方法については、以下の「III. 本発明の各タンパク質の機能(活性)に基づくスクリーニング」の項に記述する。

【0172】

I. 受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング

本発明タンパク質のうち、FcγRIIIb、L-セレクトインおよびTLR2は受容体であり、そのリガンド（受容体結合物質）として以下のものが知られている。

・FcγRIIIa：IgG（モノマー）、3G8（FcγRIIIaのモノクローナル抗体）

・FcγRIIIb：IgG（集合体）

・L-セレクトイン：シアリルルイス酸、GlyCAM-1

・TLR2：バクテリア由来のリポタンパク質、ペプチドグリカン

【0173】

またMig、NRG-2、Mip-1β及びIL-8はリガンドであり、その受容体として以下のものが知られている。

・Mig：CXCR3

・NRG-2：EGFR、ERBB2, 3, 4

・Mip-1β：CCR5

・IL-8：CXCR1、CXCR2

【0174】

よって、これら本発明タンパク質（FcγRIIIa、FcγRIIIb、L-セレクトイン、TLR2、Mig、NRG-2、Mip-1β及びIL-8）の機能または活性の低下をもたらす被験物質（候補物質）のスクリーニングは、被験物質が、前記受容体とリガンドとの結合を阻害するか否かを測定することによって行うことができる。具体的には本発明のスクリーニング方法は、次の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

（a） 被験物質の存在下で、前記受容体と前記リガンドとを接触させる工程、

（b） 上記受容体に対するリガンドの結合量を測定し、当該結合量を、被験物質非存在下で受容体とリガンドとを接触させることによって得られる受容体に対するリガンドの結合量（対照結合量）と比較する工程、及び

（c） 上記（b）の結果に基づいて、対照結合量に比して結合量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0175】

この場合、前記受容体とリガンドとの結合阻害は、▲1▼受容体に結合することによって、リガンドの受容体への結合を阻害する態様のものであってもよいし、▲2▼リガンドに結合することによって、リガンドの受容体への結合を阻害する態様のものであってもよい。但し、とりわけ▲1▼の態様の場合は、受容体に結合してもリガンドと同じ作用を発揮しない被験物質を選択することが必要である。このため、上記のスクリーニング方法で選別された被験物質は更に、下記：

（d） 上記（c）で選別された被験物質の中から、更にリガンドと同じ作用を発揮しない被験物質を選択する工程、
に供することが好ましい。

【0176】

本発明スクリーニングで用いる受容体は、精製物（単離物）であっても良いし、当該受容体を含有する細胞またはその細胞画分の形態であっても良い。

本発明スクリーニングで用いる受容体を含有する細胞は、当該受容体を天然に発現している細胞を用いても良いし、また当該受容体をコードする遺伝子を細胞に導入して作製した形質転換細胞を用いても良い。

【0177】

前記形質転換細胞は、Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い、当業者にとって公知の方法で調製することができる。例えば、前記受容体のcDNAをpCAGGS (Gene 108, 193-199 (1991))、pcDNA1.1、pcDNA3.1誘導體（インビトロジェン社）などの公知の発現ベクターに挿入する。その後、適当な宿主に導入し、培養することにより、導入した受容体のDNAに対応するタンパク質を発現させた形質転換細胞を作製することができる。宿主と

10

20

30

40

50

しては、一般的に広く普及している、CHO細胞、C127細胞、BHK21細胞、COS細胞などを用いることができるが、これに限定されることなく、酵母、細菌、昆虫細胞などを用いることもできる。

【0178】

受容体タンパク質のcDNAを有する発現ベクターの宿主細胞への導入方法としては、公知の発現ベクターの宿主細胞への導入方法であれば、どのような方法でもよく、例えばリン酸カルシウム法(J. Virol., 52, 456-467(1973))、LT-1(Panvera社製)を用いる方法、遺伝子導入用リピッド(Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL社製)を用いる方法などが挙げられる。

10

前記受容体を天然に発現する細胞、および前記受容体を発現する形質転換細胞は、そのままスクリーニングに用いることができるが、細胞膜をスクリーニングに用いる場合は、例えば以下のようにして細胞膜画分を得ることができる。すなわちまず細胞に低張バッファを添加し、細胞を低張破壊した後、ホモジナイズし、遠心分離することにより細胞膜画分の沈殿物を得る。そしてこの沈殿物をバッファに懸濁することにより、受容体を含有する細胞膜画分を得ることができる。得られた細胞膜画分は、抗体を結合させたカラム等により常法で精製することもできる。

【0179】

本発明スクリーニングで用いられる前記リガンドも、前記受容体と同様の手法で調製された形質転換細胞から、常法により組換えタンパクを回収することにより得ることができる。さらに、前記天然リガンドの他、アゴニストリガンドとして公知のものも用いることができる。

20

これらリガンドは、そのまま用いても良いし、任意の標識物質で標識されたものを用いることもできる。ここで標識物質としては、放射性同位体(^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 等)、蛍光物質(Molecular Probes社Alexa Protein Labeling Kits等)、化学発光物質(Assay Designs社Chemiluminescence Labeling Kit等)、ビオチン(Pierce社EZ-Link Biotinylation Kits等)、マーカータンパク質、またはペプチドタグなどを例示することができる。マーカータンパク質としては、例えばアルカリフォスファターゼ(Cell, 63, 185-194, 1990)、抗体のFc領域(Genbank accession number M87789)、またはHRP(Horse radish peroxidase)などの従来公知のマーカータンパク質を挙げることができる。またペプチドタグとしては、例えばMycタグ、Hisタグ、FLAGタグなどの従来公知のペプチドタグを挙げることができる。

30

【0180】

受容体結合阻害活性の測定は、具体的には、以下の方法が例示される。すなわち、前記受容体を含有する水溶液(通常緩衝液が用いられる)、前記細胞若しくは細胞膜画分に、 $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの適当な濃度に調製した被験化合物溶液(通常溶媒には水もしくは緩衝液が用いられるが、溶解度に応じてエタノールやDMSOを添加することもできる)を加えた後、標識した前記リガンドを加え、一定時間(通常、10分~2時間)反応させる。その後遠心分離等により上清を単離して放射活性を測定し、上清中に含まれる標識したリガンド量を計測することができる。あるいは、形質転換細胞もしくは細胞膜画分を含む沈殿物を界面活性剤、塩基を含む溶液に溶解し、その放射活性を測定し、沈殿物に含まれる標識リガンド量を計測することもできる。

40

【0181】

上記の数値を、被験化合物の代わりに溶媒をブランクとして用いて実施した場合の値(対照結合量)と比較することにより、被験化合物が、受容体と標識リガンドの結合を阻害するか否かを評価することができる。すなわち候補物質のスクリーニングは、被験物質存在下での結合量が、被験物質非存在下での結合量に比して、減少するか否かを指標にして行うことができる。

50

具体的な阻害率（％）については、以下の式：

$\{1 - (\text{被験物質を添加した場合に本発明タンパク質と結合した標識アゴニストリガンド量}) / (\text{被験物質非添加時における本発明タンパク質と結合した標識アゴニストリガンド量})\} \times 100$

で算出することによって求めることができる。

【0182】

1.1. GPCR活性に基づくスクリーニング

本発明タンパク質のうち、Mig、Mip-1 β 及びIL-8はいずれもリガンドであり、その受容体は以下の如きGPCR（G蛋白共役型受容体；G-protein coupled receptor）であることが知られている。

Mig：CXCR3

Mip-1 β ：CCR5

IL-8：CXCR1、CXCR2

【0183】

また本発明タンパク質のうちHM74はGPCRである。よって、これら本発明タンパク質（Mig、Mip-1 β 及びIL-8及びHM74）の機能または活性の低下をもたらす被験物質（候補物質）のスクリーニングは、GPCR活性を阻害するか否かを測定することによって、行うことができる。以下、代表的な手法として、（1）GTPとの結合活性に基づくスクリーニング、及び（2）GPCRの生理活性に基づくスクリーニングについて記述する。

【0184】

（1）GTPとの結合活性に基づくスクリーニング

GPCRとの結合活性に基づくスクリーニングは、GPCRがGDP存在下でGTPアナログであるGTP γ Sと結合する性質を利用して行うことができる。すなわち本発明のスクリーニングは、GPCRとGTP γ Sとの結合（より具体的にはGPCRとGタンパク質との複合体とGTP γ Sとの結合）を被験物質が阻害（抑制）するか否かを測定することによって、行うことができる。具体的には本発明のスクリーニング方法は、次の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

（a）被験物質の存在下で、前記GPCR、前記リガンドおよびGTPを接触させる工程、

（b）上記（a）の工程に起因して生じるGTP結合量を測定し、当該結合量を、被験物質非存在下でGPCR、リガンドおよびGTPを接触させることによって得られるGTP結合量（対照結合量）と比較する工程、及び

（c）上記（b）の結果に基づいて、対照結合量に比してGTP結合量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0185】

本発明スクリーニングで用いるGPCRを含有する細胞は、当該GPCRを天然に発現している細胞を用いても良いし、また当該GPCRをコードする遺伝子を細胞に導入して作製した形質転換細胞を用いても良い。具体的には、以下の方法が例示される。

すなわち、当業者に公知の方法を用いて、前記GPCRの発現ベクターを作製し、CHO-K1細胞・HEK293細胞等に過剰発現させた形質転換細胞か、若しくは前記GPCRを天然に発現している細胞を準備する。ここで、必要に応じて、Gタンパク質の発現ベクターを共発現させることもできる。次に、前記細胞から遠心分離等の操作により、細胞膜画分を調製する。これを、適当な緩衝液などの溶媒中で、前記リガンドおよび被験物質とともに混合し、一定時間（例えば、30分～2時間）インキュベートする。更に、 $[^3\text{H}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ を混合し、一定時間（例えば、30分～2時間）インキュベートする。ガラスフィルター上で、緩衝液で洗浄することにより結合反応を終了させた後、フィルター上の放射活性を測定することにより、前記GPCRとGタンパク質との複合体に結合した $[^3\text{H}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ 量を算出することができる。候補物質のスクリーニングは、被験物質存在下での $[^3\text{H}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ 結合量が、被験物質非存在下での $[^3\text{H}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$

]-GTPγS 結合量に比して、減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0186】

なお、リガンドが不明である HM74 については、HM74 および G タンパク質の融合タンパク質を用いる方法、GPCR に mutation を入れる方法、あるいは過剰発現させる方法等を用いることにより、リガンド非存在下で上記のスクリーニングを実施することができる。これについては、本明細書実施例、および *Methods in Enzymology*, 343:260-73, 2002, *J Biol Chem*, 276:35883-90, 2001 に記載された方法に従って実施することができる。

【0187】

(2) GPCR の生理活性に基づくスクリーニング

10

GPCR にアゴニストリガンドが結合することによって生ずる生理活性を指標として、GPCR の機能(活性)を抑制する候補物質を選別することもできる。具体的には本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質の存在下で、前記受容体と前記リガンドとを接触させる工程、

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるGPCRを介した生理活性を測定し、当該生理活性を、被験物質非存在下で受容体とリガンドとを接触させることによって得られるGPCRを介した生理活性(対照生理活性)と比較する工程、及び

(c) 上記(b)の結果に基づいて、対照生理活性に比して生理活性を低下させる被験物質を選択する工程。

【0188】

20

ここでGPCRを介した生理活性としては、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内カルシウムイオン濃度の増加もしくはその抑制、細胞内cAMP濃度の増加もしくはその抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos活性化、cAMP応答性エレメントのレポータージーンの活性化もしくはその抑制等が挙げられる。

該生理活性は、公知の方法、または市販の測定用キットを用いて測定することができる。すなわち、前記GPCRを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。新鮮な培地、あるいは細胞毒性を示さない適当なバッファーに交換し、被験化合物、および/またはリガンド等を添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出、あるいは上清液を回収して生成した産物をそれぞれ該当する方法に従って定量する。生理活性の指標とする物質(例えばアラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって測定不能な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を併用することもできる。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の産生量を増大させて、感度良く測定することもできる。

30

【0189】

具体的な測定手順としては、Fluorescent imaging plate reader (FLIPR)を用いて、細胞内カルシウム濃度の変動を検出することなどが挙げられる。前記GPCRが、Gq蛋白ではなくGs蛋白もしくはGi蛋白と共役して存在する場合でも、そのシグナルをGqタイプのシグナルに変換し、細胞内カルシウムイオン量を測定することにより、スクリーニングを行うことができる。すなわち、

40

1) 前記GPCR遺伝子の発現ベクターと、Gq蛋白、もしくはGqs5蛋白(Gqs5とは、C末端に、Gs蛋白のC末端アミノ酸5残基を置換したGq蛋白を意味する。)、もしくはGqi5蛋白(Gqi5とは、C末端に、Gi蛋白のC末端アミノ酸5残基を置換したGq蛋白を意味する。)の発現ベクターを作製する。ここで、細胞株としては、CHO-K1細胞等を用いることができ、上記発現ベクターを遺伝子導入試薬Lipofectamine (Invitrogen社)等を用いて共導入することができる。

2) 次に該細胞を、probenecid(色素を細胞内に保持するために、multiple drug-resistance pumpの阻害剤として用いる。)、およびFluo-3 AM(Molecular Probe社)等のカルシウムイオンによって蛍光活性を示す色素を含むF12培養培地中で、CO₂インキュベーターにて一定時間

50

(例えば30分～2時間)培養する。

3) リガンドを *probenecid* を含む HBS 等の培養培地に溶解した溶液を、添加し、2分後まで FLIPR にて計測する。検出は、488nm のアルゴンレーザーで細胞を励起し、カルシウムイオンが結合した *Fluo-3* の蛍光を 500～560nm の波長でとらえることによって行う。リガンド添加直後から60秒後までの蛍光強度から、添加前の値をバックグラウンドとして差し引いた値を活性とする。被験物質を添加する場合はリガンドを添加する前に添加し、その後リガンドを添加する。

4) 候補物質の選択は、被験物質の存在下におけるカルシウムイオン量が、被験物質非存在下におけるカルシウムイオン量に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

10

【0190】

また、cAMP 応答性エレメントのレポータージーンアッセイを用いる方法は、前記 GPCR にリガンドが結合して生じるシグナル伝達により活性化される cAMP 応答性エレメント (CRE) の下流にルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、成長ホルモン、GFP などのレポーター遺伝子を連結し、レポータージーンアッセイを行う方法である。すなわち、

1) 前記 GPCR 遺伝子の発現ベクターと、Gタンパク (Gs、Gi) の発現ベクター、および cAMP 応答性エレメント (CRE) の下流にルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、成長ホルモン、GFP などのレポーター遺伝子を連結した遺伝子を作製する。ここで、細胞株としては、CHO-K1 細胞等を用いることができ、上記発現ベクターを遺伝子導入試薬 *Lipofectamine* (*Invitrogen* 社) 等を用いて共導入することができる。また、前記 Gタンパクを発現している細胞を用いる場合は、前記 GPCR の遺伝子発現ベクターおよびレポーターベクターのみを導入する。

20

2) 次に該細胞を、適当な培地中で、CO₂ インキュベーターにて一定時間 (例えば4～8時間) 培養する。

3) 培地交換後、リガンドを適当な培養培地に溶解した溶液を添加し、一定時間 (4時間～24時間) 後、レポーター活性を測定する。例えばルシフェラーゼの場合は、細胞溶解液で細胞を溶かし、その一部分を用いてルシフェラーゼ基質溶液 (プロメガ社 *Luciferase assay system* 等) と反応させた際の発光をルミノメーターで測定する。被験物質はリガンドを添加する前に添加する。

30

4) 候補物質の選択は、被験物質の存在下におけるレポーター活性が、被験物質非存在下におけるレポーター活性に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0191】

III. 本発明の各タンパク質の機能 (活性) に基づくスクリーニング

以下、本発明タンパク質の各々の機能 (活性) に基づくスクリーニング方法につき例示する。

【0192】

(1) FcγR IIIa の機能 (活性) に基づくスクリーニング方法

免疫グロブリンの構造は、抗原結合部位を形成する Fab とよばれる部分と補体などを結合する Fc と呼ばれる部分より構成されている。この Fc 部位と特異的に結合する分子が Fc 受容体で、IgG に対するものが FcγR である。このうち FcγR III は CD16 とよばれ、FcγR IIIa はマクロファージ、単球、NK 細胞、マスト細胞、好酸球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞などで発現、FcγR IIIb は好中球 (多形核白血球) と IFN-γ によって活性化された好酸球にて発現していることが知られている。

40

FcγR IIIa の機能として IgG や FcγR IIIa に対するモノクローナル抗体 (3G8 など) との結合 (Edberg, J. C. ら, J. Immunol., 159, 3849-3857, 1997) や、結合によって起こる TNF-α、IL-1β、IFN-γ、IL-2R、c-fos 等の産生増加 (Cassatelli a

50

M. A. ら、J. Exp. Med., 169, 549-567, 1989、Anegón, I. ら、J. Exp. Med., 167, 452-472, 1988、Sulica, A. ら、Eur. J. Immunol., 26, 1199-1203, 1996、Trotta, R. ら、J. Exp. Med., 184, 1027-1035, 1996)、細胞内カルシウムやIP3の濃度の上昇(Cassatella, M. A. ら、J. Exp. Med., 169, 549-567, 1989)、Vav、PLC- γ 1、PLC- γ 2、pp70等のリン酸化(Xu, X. ら、Biochem. J., 318, 527-532, 1996、Liao, F. ら、J. Immunol., 150, 2668-2674, 1993、Vivier, E. ら、Eur. J. Immunol., 23, 1872-1876, 1993)、NK細胞の増殖変化(IgGモノマー[mIgG]とIL-2共存にて亢進、3G8[モノクローナル抗体]とIL-2共存にて低下)、Cytotoxicity活性の減少(Sulica, A. ら、J. Immunol., 128, 1031-1036, 1982、IL-2非存在下の3G8刺激では増加[Sulica, A. ら、Eur. J. Immunol., 26, 1199-1203, 1996])などが知られている。従って、該Fc γ R IIIaの公知の性質に基づいて、Fc γ R IIIaの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0193】

▲1▼Fc γ R IIIaとIgGとの結合活性

Fc γ R IIIaとIgGとの結合作用を利用することにより、Fc γ R IIIaの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

- (a) 被験物質の存在下で、Fc γ R IIIaとIgGとを接触させる工程、
- (b) Fc γ R IIIaに対するIgGの結合量を測定し、当該結合量を、被験物質非存在下でFc γ R IIIaとIgGとを接触させることによって得られるFc γ R IIIaに対するIgGの結合量(対照結合量)と比較する工程、及び
- (c) 上記(b)の結果に基づいて、対照結合量に比して結合量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0194】

当該スクリーニングは、前記I.「受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング」に記載の方法に基づき行うことができる。ここでFc γ R IIIaとしては、Fc γ R IIIaを発現する細胞又はその細胞膜画分を用いることが好ましく、具体的には前述のNK細胞を挙げることができる。

【0195】

▲2▼Fc γ R IIIaの細胞内カルシウムイオン増加活性

Fc γ R IIIaの有する細胞内カルシウムイオン増加活性を利用することにより、Fc γ R IIIaの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

- (a) 被験物質と、Fc γ R IIIa発現細胞、およびFc γ R IIIa作動性リガンド(IgG、3G8など)を接触させる工程、
- (b) 被験物質を接触させた上記細胞の細胞内カルシウムイオン増加活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞の細胞内カルシウムイオン増加活性と比較する工程、
- (c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞の細胞内カルシウムイオン増加活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0196】

ここでFc γ R IIIaの細胞内カルシウムイオン増加活性は、Cassatella, M. A. ら、J. Exp. Med., 169, 549-567, 19

89 に記載の方法を参考にして測定することができる。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した場合の細胞内カルシウムイオン増加量が、被験物質を添加しない場合の細胞内カルシウムイオン増加量に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0197】

▲3▼細胞活性化活性

FcγR I I I aが発現しているNK細胞をFcγR I I I a作動性リガンド(IgG、3G8 など)などで刺激することで細胞の活性化、サイトカインやIL-2Rの産生が起こることが知られている。従って、該活性を利用することにより、FcγR I I I aの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む： 10

(a) 被験物質と、FcγR I I I aを発現しておりかつサイトカインもしくはIL-2Rの産生が可能な細胞、およびFcγR I I I a作動性リガンドとを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた上記細胞のサイトカインもしくはIL-2R産生量を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞のサイトカインもしくはIL-2R産生量と比較する工程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞のサイトカインもしくはIL-2R産生量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0198】

ここで用いられる「FcγR I I I aを発現しておりかつサイトカインもしくはIL-2Rの産生が可能な細胞」としては、NK細胞などが挙げられる。また「FcγR I I I a作動性リガンド」としては、3G8などのモノクローナル抗体やIgGなどが挙げられる。また測定対象である「サイトカイン」としては、炎症性サイトカインであるTNF-α、IL-1β、IFN-γなどが挙げられる。当該サイトカイン産生量の測定は、例えばSulica, A. ら、Eur. J. Immunol., 26, 1199-1203, 1996、やAnegon, I. ら、J. Exp. Med., 167, 452-472, 1988 に記載の方法を参考にすることができる。 20

【0199】

▲4▼FcγR I I I aのシグナル活性化

FcγR I I I aにリガンドが結合することによって、pp70、Vav、MAPK等の細胞内シグナル伝達分子が活性化され、c-fos遺伝子の発現量が増加することが知られている。従ってこれらの活性化を検出することによって、またはc-fos遺伝子の発現を検出することによっても、FcγR I I I aの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む： 30

(a) 被験物質と、FcγR I I I a発現細胞、およびFcγR I I I a作動性リガンドとを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた上記細胞のpp70、Vav、MAPKの活性化もしくはc-fos遺伝子の発現量を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞のpp70、Vav、MAPKの活性化もしくはc-fos遺伝子の発現量と比較する工程、 40

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞のpp70、Vav、MAPKの活性化もしくはc-fos遺伝子の発現を抑制する被験物質を選択する工程。

【0200】

ここで用いられる「FcγR I I I a発現細胞」としては、NK細胞などが挙げられる。また「FcγR I I I a作動性リガンド」としては、3G8などのモノクローナル抗体やIgGなどが挙げられる。また「pp70、Vav、MAPKの活性化」とは、具体的には各因子のリン酸化をさす。当該活性化に関わる各因子の活性化およびc-fos遺伝子発現量の測定は、例えばXu, X. ら、Biochem. J., 318, 527-532, 1996や、Vivier, E. ら、Eur. J. Immun 50

no 1., 23, 1872-1876, 1993 等に記載の方法を参考にして行うことができる。

【0201】

(2) FcγR IIbの機能(活性)に基づくスクリーニング方法

FcγR IIb 発現細胞はIgGでコートされた粒子や可溶性免疫複合体を効率よく貪食、またはエンドサイトーシスにより取り込み、代謝と自然免疫に寄与するとともに、抗原ペプチドを再び提示してT細胞を活性化し、免疫応答の賦活にも寄与する。FcγR IIb の細胞外部分が遊離し(可溶性レセプター)、Ig結合因子となってIg産生を調節すること、好中球のアポトーシスを抑制することなどが知られている。(Regnault, A. ら、J. Exp. Med., 189, 371-80, 1999、Teillaud, J. L. ら、Immunomethods, 4, 48-64, 1994、Durand, V. ら、Eur. J. Immunol., 31, 1952-1961, 2001)。従って、該FcγR IIb の公知の性質に基づいて、FcγR IIb の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0202】

▲1▼FcγR IIbの貪食活性

細胞表面にFcγR IIbを発現している細胞がIgGを貪食する作用を利用することにより、FcγR IIbの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質と、FcγR IIbを発現する細胞およびIgGを接触させる工程

(b) 被験物質を接触させた上記細胞のIgGの貪食活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞のIgGの貪食活性と比較する工程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞のIgGの貪食活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0203】

ここでFcγR IIbのファゴサイト(貪食作用)活性は、例えばLew, D. P. ら、Nature, 315, 509-511, 1985 およびHed, J. ら、Immunology, 45, 727-736, 1982の方法を参考にして測定することができる。すなわち、ボランティアから採血し、精製した好中球と、FITCで標識した酵母を、抗酵母抗体(Lew, D. P. ら、Nature, 315, 509-511, 1985 およびHed, J. ら、Immunology, 45, 727-736, 1982)とともにインキュベートして作製したFITC-IgG粒子を用いる。好中球とFITC-IgG粒子をインキュベートした後、細胞外のFITC-IgG粒子をトリパンブルーでクエンチングし、細胞内に取り込まれたFITCの蛍光をモニターする。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した前記細胞におけるFITC量が、被験物質を添加しない対照細胞の当該FITC量に比して、減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0204】

▲2▼FcγR IIbとIgGとの結合活性

FcγR IIbとIgGとの結合作用を利用することにより、FcγR IIbの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質の存在下で、FcγR IIbとIgGとを接触させる工程、

(b) FcγR IIbに対するIgGの結合量を測定し、当該結合量を、被験物質非存在下でFcγR IIbとIgGとを接触させることによって得られるFcγR IIbに対するIgGの結合量(対照結合量)と比較する工程、及び

10

20

30

40

50

(c) 上記(b)の結果に基づいて、対照結合量に比して結合量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0205】

当該スクリーニングは、前記I.「受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング」に記載の方法に基づき行うことができる。ここでFcγRIIbとしては、FcγRIIbを発現する細胞又はその細胞膜画分を用いることが好ましく、具体的には前述の好中球を挙げることができる。

【0206】

その他、FcγRIIbのRespiratory burst活性に基づくスクリーニングは、例えばCoxon, P. Y. ら、J. Immunol., 164, 6530-6537, 2000、およびDurand, V. ら、Eur. J. Immunol., 31, 1952-1961, 2001の方法を参考にして行うことができる。さらに、MAP kinaseの活性化(Coxon, P. Y. ら、J. Immunol., 164, 6530-6537, 2000)、細胞内カルシウムイオン濃度変化(Chuang, F. Y. S. ら、J. Immunol., 164, 350-360, 2000)、可溶性FcγRIIbによる細胞粘着性やアポトーシスの抑制作用(Durand, V. ら、Eur. J. Immunol., 31, 1952-1961, 2001)といったFcγRIIbの他の活性を指標としても、本発明のスクリーニングを行うことができる。

【0207】

(3) Migの機能(活性)に基づくスクリーニング方法

Mig(monokine induced by gamma interferon)はCXCスーパーファミリーに属するケモカインの一種で、インターフェロンの刺激によってマクロファージなどで作られ、T細胞を遊走させる作用を有する。また、その受容体はCXCR3であることが知られている。従って、該Migの公知の性質に基づいて、Migの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0208】

▲1▼MigとCXCR3との結合活性

MigとCXCR3との結合活性を利用することにより、Migの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質の存在下で、CXCR3とMigとを接触させる工程、

(b) CXCR3に対するMigの結合量を測定し、当該結合量を、被験物質非存在下でCXCR3とMigとを接触させることによって得られるCXCR3に対するMigの結合量(対照結合量)と比較する工程、及び

(c) 上記(b)の結果に基づいて、対照結合量に比して結合量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0209】

当該スクリーニングは、前記I.「受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング」に記載の方法により行うことができる。ここでCXCR3としては、CXCR3を発現する細胞又はその細胞膜画分を用いることが好ましく、具体的には human tumor-infiltrating T lymphocytes (TIL)や、CXCR3の遺伝子(GenBank Acc. No. NM_001504)を導入した形質転換細胞を挙げることができる。

【0210】

▲2▼T細胞遊走活性

MigによるT細胞遊走活性を利用することにより、Migの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

- (a) 被験物質と、活性化T細胞およびMigを接触させる工程、
(b) 被験物質を接触させた上記細胞の遊走活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞の遊走活性と比較する工程、
(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞の遊走活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0211】

その他、Migの細胞遊走活性に基づくスクリーニングは、例えばMeyer, M.ら、Eur. J. Immunol., 31, 2521-2527, 2001に記載の方法を参考にして測定することができる。

【0212】

当該MigのT細胞遊走活性は、例えばGasperini, S.ら、J. Immunol. 162, 4928-4937, 1999に記載の方法を参考にして測定することができる。

【0213】

その他、CXCR3のGPCR活性に基づくスクリーニングは、前記II、「GPCR活性に基づくスクリーニング」に記載の方法に基づき行うことができる。具体的には、例えばMigによる細胞内カルシウムイオン増加活性は、例えばLiao, F.ら、J. Exp. Med. 1995 (182) 1301-1314に記載の方法を参考にして測定することができる。すなわち、human tumor-infiltrating T lymphocytes (TIL) などCXCR3レセプターを発現している細胞にMigを添加し、細胞内カルシウムイオン濃度の測定を行うことによりスクリーニングすることができる。

【0214】

(4) NRG-2の機能(活性)に基づくスクリーニング方法

NRG(ニューレグリン)-2は、EGF(上皮成長因子)ファミリーに含まれる成長・分化因子の1つである。ニューレグリンの受容体は、膜貫通型のタイロシンカイネースであるERBBファミリーの、EGF受容体、ERBB2、ERBB3、ERBB4などである。ERBBとインターラクションすることで、上皮細胞、神経細胞、グリア細胞などの他、様々なタイプの細胞の増殖と分化を誘導すること、また神経および心臓組織の発達、癌の形成に関与することなどがわかっている。従って、該NRG-2の公知の性質に基づいて、NRG-2の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0215】

▲1▼NRG-2によるERBB発現細胞の増殖活性

NRG-2によるERBB発現細胞の増殖活性を利用することにより、NRG-2の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

- (a) 被験物質と、NRG-2反応性細胞(上皮細胞もしくは神経グリア細胞など)およびNRG-2を接触させる工程、
(b) 被験物質を接触させた上記細胞の増殖活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞の増殖活性と比較する工程、
(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞の増殖活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0216】

ここでNRG-2によるERBB発現細胞の増殖活性は、例えばPignatelli, M.ら、J. Cell Science, 114, 4117-4126, 2001に記載の方法を参考にして測定することができる。すなわち、MCF-7などのNRG-2反応性細胞にNRG2を添加し、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量を測定する。ここで用いるNRG-2はCarrawayらの方法(Nature, 387, 51

10

20

30

40

50

2-516, 1997) にて調製したものをを用いても良い。すなわち、NRG-2 の EGF 様ドメイン (アミノ酸配列 246-314) とグルタチオン-S-トランスフェラーゼの融合蛋白質を、High Five 細胞 (昆虫細胞) にて発現させ、グルタチオン親和性カラムにて回収したものをを用いることもできる。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した前記細胞における [^3H] チミジンの取り込み量が、被験物質を添加しない対照細胞の当該 [^3H] チミジンの取り込み量に比して、減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0217】

その他、NRG-2 の ERBB への結合およびチロシンリン酸化に基づくスクリーニングは、前記 I. 「受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング」に記載の方法や、Carraway, K. L. 3rd ら、Nature, 387, 512-516, 1997 に記載の方法や、Chang, H. ら、Nature, 387, 509-512, 1997 に記載の方法を参考にして行うことができる。

【0218】

(5) ヘキソキナーゼ 3 の機能 (活性) に基づくスクリーニング方法

ヘキソキナーゼは、ATP と D-ヘキソースより、ADP と D-ヘキソース 6-リン酸を生じる反応を触媒する (EC 2. 7. 1. 1)。反応にはマグネシウムイオンを必要とする。生体内において反応は不可逆であり、解糖系の律速の一つとなっている。生成物 D-グルコース 6-リン酸で反応が阻害される。3 種のアイソザイム I ~ III が存在し、III 型 (ヘキソキナーゼ 3) は D-グルコースに対する K_m 値が小さい (I: 10 μM , II: 100 μM , III: 1 μM のオーダー) (酵素ハンドブック 第 6 刷 朝倉書店 330-331)。従って、該ヘキソキナーゼ 3 の公知の性質に基づいて、ヘキソキナーゼ 3 の機能 (活性) を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0219】

▲1 ▼ヘキソキナーゼ 3 の酵素活性

ヘキソキナーゼ 3 の前記酵素活性を利用することにより、ヘキソキナーゼ 3 の機能 (活性) を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む：

(a) 被験物質と、ATP、D-ヘキソースおよびヘキソキナーゼ 3 を水溶液中で接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた水溶液の D-ヘキソース 6-リン酸生成量を測定し、該量を被験物質を接触させない対照水溶液の D-ヘキソース 6-リン酸生成量と比較する工程、

(c) (b) の比較結果に基づいて、上記水溶液の D-ヘキソース 6-リン酸生成量を減少させる被験物質を選択する工程。

【0220】

当該ヘキソキナーゼ 3 の活性は、例えば生化学実験講座 12 エネルギー代謝と生体酸化上 104-108 に記載の方法を参考にして測定することができる。すなわち、精製酵素溶液もしくは溶血上清液と MgCl_2 、NADP、グルコース (ヘキソース)、ATP、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (溶血上清液の場合不要) をインキュベートする。ヘキソキナーゼ活性によって生成したグルコース-6-リン酸と、あらかじめ添加してある NADP を基質として、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼが NADPH を生成するので、これを 340 nm の吸光度にて測定する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した水溶液における D-ヘキソース 6-リン酸生成量が、被験物質を添加しない対照水溶液の当該 D-ヘキソース 6-リン酸生成量に比して、減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0221】

(6) HM74 の機能 (活性) に基づくスクリーニング方法

10

20

30

40

50

HM74は、IL-8、C5a、FP (N-formyl peptide) などのレセプターに共通な配列を用いて、ヒトモノサイトからクローニングされたGPCRである(Nomura, H.ら、International Immunology, 5, 1239-1249, 1993)。

当該HM74の活性は、HM74がGDP存在下でGTPアナログであるGTPγSと結合する性質を利用して測定することが出来る。すなわち本発明のスクリーニングは、被験物質がHM74とGTPγSの結合を阻害(抑制)するか否かを測定することによって、行うことができる。具体的には本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質の存在下で、HM74を過剰発現する細胞又は該細胞から調製した細胞膜画分とGTP(GTPγS)とを接触させる工程、 10

(b) 上記(a)の工程に起因して生じるGTP結合量を測定し、当該結合量を、被験物質非存在下でHM74を発現する細胞又は該細胞から調製した細胞膜画分とGTPとを接触させることによって得られるGTP結合量(対照結合量)と比較する工程、及び

(c) 上記(b)の結果に基づいて、対照結合量に比してGTP結合量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0222】

当該スクリーニングは、前記II.「GPCR活性に基づくスクリーニング」に記載の方法により行うことができる。HM74はリガンド不明であるが、細胞に過剰発現させることにより、リガンド非存在下で前記のスクリーニングを行うことが可能である。 20.

【0223】

(7) REG IIIの機能(活性)に基づくスクリーニング方法

REG及びREG related genesはカルシウム依存性レクチンファミリーに属する。消化管基底層や組織損傷部において発現される再生に関与する遺伝子群である。Reg IIIは別名PAP(Pancreatic-associated protein)とも呼ばれる。PAPは膵炎の急性期にその発現が大きく増加することと、肝臓ガンにて発現が大きく増加するHIP(Hepatocarcinoma-intestine-pancreas)と同一であることが知られている。他には運動神経の損傷、胃粘膜の損傷などにおいても発現が増加することが知られている。機能として、シュワン細胞の増殖促進のほか、細菌の凝集、細胞外マトリックスへの吸着、TNF-α誘導性アポトーシスの抑制などが知られている(OMIMデータベース:167805、およびChrista, Lら、Am J Physiol, 271, 993-1002, 1996、およびMalika, Dら、Gastroenterology, 119, 816-828, 2000、およびHartupée, J. C.ら、Biochim Biophys Acta, 1518, 287-293, 2001)。従って、該REG IIIの公知の性質に基づいて、REG IIIの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0224】

▲1▼REG IIIのアポトーシス抑制活性 40

REG IIIの有するアポトーシス抑制活性を利用することにより、REG IIIの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質と、膵臓由来細胞もしくはREG III発現細胞、およびアポトーシス誘導物質(TNF-α等)を接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた細胞のアポトーシスを測定し、該アポトーシスを被験物質を接触させない対照細胞のアポトーシスと比較する工程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞のアポトーシスの抑制を解除する被験物質を選択する工程。

【0225】

ここでREG IIIのアポトーシス抑制活性は、Malika, Dら、Gastroenterology, 119, 816-828, 2000の方法を参考にして測定することができる。すなわち、AR4-2J細胞（ラット膵臓腺房細胞）を調製し、REG III遺伝子を導入する。TNF- α 、アクチノマイシンDとともに72時間インキュベートし、MTSなどの試薬を添加することによって、生存細胞の割合、すなわちアポトーシスの割合を吸光度にて測定する。ベクターのみを導入したAR4-2Jを0%アポトーシス抑制活性、20 μ MのZ-VAD-FMK（アポトーシス阻害剤）を添加したものを100%アポトーシス抑制活性を示すコントロールとして用いても良い。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した細胞における生存の割合が、被験物質を添加しない対照細胞における生存の割合に比して、減少するか否かを指標にして行うことができる。

10

【0226】

▲2▼REG IIIの細菌凝集活性

REG IIIの有する細菌凝集活性を利用することにより、REG IIIの機能（活性）を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

- （a） 被験物質と、細菌およびREG IIIを接触させる工程、
- （b） 被験物質を接触させた細菌の凝集活性を測定し、該凝集活性を被験物質を接触させない対照細菌の凝集活性と比較する工程、
- （c） （b）の比較結果に基づいて、上記細菌の凝集活性を抑制する被験物質を選択する工程。

20

【0227】

ここでREG IIIの細菌凝集活性は、Iovanna, J, ら、J Biol Chem, 266, 24664-24669, 1991の方法を参考にして測定することができる。すなわち、JM101株などの大腸菌懸濁液にREG IIIを添加することにより数分から3時間後には大腸菌の凝集を観察することができる。ネガティブコントロールとして、アルブミン、ポジティブコントロールとしてコンカナバリンAを用いても良い。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した場合の細菌凝集が、被験物質を添加しない場合の細菌凝集に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0228】

30

▲3▼REG IIIのシュワン細胞増殖活性

REG IIIの有するシュワン細胞増殖活性を利用することにより、REG IIIの機能（活性）を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程（a）、（b）及び（c）を含む：

- （a） 被験物質と、REG III反応性細胞（シュワン細胞）およびREG IIIを接触させる工程、
- （b） 被験物質を接触させた上記細胞の増殖活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞の増殖活性と比較する工程、
- （c） （b）の比較結果に基づいて、上記細胞の増殖活性を抑制する被験物質を選択する工程。

40

【0229】

ここでREG IIIのシュワン細胞増殖活性は、Livesey F. J. ら、Nature, 390, 614-618, 1997の方法を参考にして測定することができる。すなわち、ラット新生仔よりシュワン細胞を初代培養する。フォルスコリン、プロモデオキシウリジン（DNA合成の指示薬）とともにREG IIIを添加し、増殖活性を測定する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した細胞の増殖活性が、被験物質を添加しない対照細胞の増殖活性に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0230】

その他、laminin-1やfibronectinへの吸着活性（Christa,

50

Lら、Am J Physiol, 271, G993-1002, 1996)、REG III 遺伝子のプロモーター領域と、転写因子 Cdx1 との結合、続いて起こる REG III 遺伝子の転写活性化、もしくは小腸上皮細胞の増殖活性 (Moucade I V. ら、Eur J Cell Biol, 80, 156-163, 2001) などの活性に基づくスクリーニングも行うことができる。

【0231】

(8) LPAP の機能 (活性) に基づくスクリーニング方法

LPAP (Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein) は 32 kDa の細胞膜結合性のリン蛋白質である。リンパ球において CD 45 と非共有結合している。CD 45 はチロシンフォスファターゼで、リンパ球の活性化に重要な役割を果たしている。従って、該 LPAP の公知の性質に基づいて、LPAP の機能 (活性) を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

10

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0232】

▲1▼ LPAP の CD 45 結合活性

LPAP 有する CD 45 結合活性を利用することにより、LPAP の機能 (活性) を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む：

(a) 被験物質と、CD 45 および LPAP を発現する細胞または該細胞から調製した細胞画分を接触させる工程、

20

(b) 被験物質を接触させた上記細胞またはその細胞から調製した細胞画分の LPAP の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞またはその細胞から調製した細胞画分の LPAP の発現量と比較する工程、

(c) (b) の比較結果に基づいて、上記細胞またはその細胞から調製した細胞画分の LPAP の発現量を抑制する被験物質を選択する工程。

【0233】

ここで LPAP の CD 45 結合活性は、Schraven, B., ら、J. Biol. Chem., 269, 29102-29111, 1994 に記載の方法を参考にして測定することができる。すなわち、Jurkat T-lymphocytes を、Brij 58 などの界面活性剤を含む氷冷 TBS (Tris-buffered saline) に溶解し、CD 45 モノクローナル抗体を結合させた CNBr-Sepharose ビーズ 3 ml に結合させることで、LPAP-CD 45 複合体の抽出を行う。次いで被験物質を含む TBS 溶液にて溶出を行い、LPAP の溶出を ELISA 法にてモニターし、LPAP が溶出されたとき、結合阻害がなされたものと判断する。もしくは、CD 45 と複合体を形成しない場合、速やかに分解されるという性質を利用する (Schraven, B., ら、J. Biol. Chem., 269, 29102-29111, 1994)。細胞としては、Jurkat 細胞、または人為的に CD 45 と LPAL を発現させた細胞を用いる。被験物質を細胞に接触させ、LPAL および CD 45 の蛋白質量を ELISA 法もしくはウェスタンブロット解析などでモニターする。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した場合の LPAP 量が、被験物質を添加しない場合の LPAP 量に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

30

40

【0234】

(9) Mip-1 β の機能 (活性) に基づくスクリーニング方法

ケモカインは、特定の白血球のサブセットの遊走作用・活性化を支配する一連のサイトカインとして発見されたものの総称である。細胞遊走惹起活性およびインテグリン等の細胞接着因子の発現増強作用、さらには細胞接着の増強作用等を有しており、炎症組織等の病変部位への白血球等の接着・浸潤過程を担う必須の蛋白質因子と考えられている。分子内には保存されたシステイン残基をもち、この分子構造上の位置より CX₂C、CC、C、C

50

X3Cの4つのサブファミリーに分類されている。

【0235】

Mip-1 β (Macrophage Inflammatory Protein-1 β 、別名スモールインデュシブルサイトカインA4)は、Mip-1 α 、MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)、RANTES (Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted cytokine)などと共にCCケモカインに分類される。Mip-1遺伝子は、活性化T-cellライブラリーよりディフアレンシャルハイブリダイゼーション法によって見つかった (ACT2遺伝子、Lipes 1988)。植物性血球凝集素によるT-cellの活性化、黄色ブドウ球菌によるB-cellの活性化、リポポリサッカライド (LPS) による単球の活性化ですみやかにその発現が誘導される。推定アミノ酸配列は92アミノ酸残基からなり、N末端部分はシグナル配列と考えられている (OMIMデータベース、エントリーナンバー182284)。

10

【0236】

ケモカインに対する特異的レセプターに関しても、その遺伝子のクローニングが進み、種々の白血球上に存在するG蛋白共役型の7回膜貫通型レセプターであることが明らかとなっている (従ってケモカインレセプター拮抗剤がケモカインの標的細胞への作用を阻害する薬剤として有用なことが期待できる)。Mip-1 α はCCR1とCCR5の、Mip-1 β はCCR5のリガンドとなることが知られている。近年、CXCR4とともにCCR5がHIV感染のコレセプターであることが判明し、エイズ治療の新たな分子標的となっている (橋本ら、Bio Science 新用語ライブラリー 免疫 第2版、羊土社、160-164)。従って、該Mip-1 β の公知の性質に基づいて、Mip-1 β の機能 (活性) を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

20

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0237】

▲1▼Mip-1 β とCCR5との結合活性

Mip-1 β とCCR5との結合活性を利用することにより、Mip-1 β の機能 (活性) を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む：

30

(a) 被験物質の存在下で、CCR5とMip-1 β とを接触させる工程、

(b) CCR5に対するMip-1 β の結合量を測定し、当該結合量を、被験物質非存在下でCCR5とMip-1 β とを接触させることによって得られるCCR5に対するMip-1 β の結合量 (対照結合量) と比較する工程、及び

(c) 上記 (b) の結果に基づいて、対照結合量に比して結合量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0238】

当該スクリーニングは、前記I. 「受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング」に記載の方法により行うことができる。ここでCCR5としては、CCR5を発現する細胞又はその細胞膜画分を用いることが好ましく、具体的には単球やヘルパーT細胞 (Th1細胞) や、CCR5の遺伝子 (GenBank Acc. No. NM_000579) を導入した形質転換細胞を挙げることができる。

40

【0239】

▲2▼Mip-1 β の細胞内カルシウムイオン増加活性

Mip-1 β の有する細胞内カルシウムイオン増加活性を利用することにより、Mip-1 β の機能 (活性) を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程 (a)、(b) 及び (c) を含む：

(a) 被験物質と、Mip-1 β 反応性細胞、およびMip-1 β を接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた上記細胞の細胞内カルシウムイオン増加活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞の細胞内カルシウムイオン増加活性と比較する工

50

程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞の細胞内カルシウムイオン増加活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0240】

ここでMip-1 β の細胞内カルシウムイオン増加活性は、前記I I、「GPCR活性に基づくスクリーニング」に記載の方法に基づき行うことができる。またLaurence, J. S.ら、Biochemistry, 39, 3401-3409, 2000およびStables, J.ら、Anal. Biochem., 252, 115-126, 1997に記載の方法を参考にして測定することができる。当該手法はaequorinの蛍光でGPCRのレスポンスを測定する方法である。すなわち、CCR5遺伝子を導入したCHO細胞に、apoequorin遺伝子、Gal6遺伝子をコードするプラスミドをさらに導入し、coelenterazine H (Molecular probes) 存在下、暗所でインキュベートする。Mip-1 β を加え、蛍光(469 nm)を測定する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した場合の細胞内カルシウムイオン増加量が、被験物質を添加しない場合の細胞内カルシウムイオン増加量に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

10

【0241】

(10) L-セ렉チンの機能(活性)に基づくスクリーニング方法

セ렉チンは、白血球が血管から組織実質に遊走する際の初期過程に必要な接着性相互作用に関与している細胞膜貫通型糖タンパク質であり、細胞外のN末端側からカルシウム依存性レクチンドメイン1個、上皮増殖因子(EGF)と相同な複数のドメインから構成される。カルシウム依存性の糖結合分子であり、シアルルイスX糖鎖(シアル酸、フコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンからなる4糖構造)および類縁の糖鎖を認識する。しかし、十分な結合親和性を得るには、糖鎖提示分子の役割が重要である。L-セ렉チンはほとんどの白血球に発現しており、分子量90 kDである。(今井ら、Bio Science新用語ライブラリー 免疫 第2版、羊土社、217-218)従って、該L-セ렉チンの公知の性質に基づいて、L-セ렉チンの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

20

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0242】

▲1▼ L-セ렉チンとL-セ렉チン結合基質との結合活性

L-セ렉チンとシアルルイス酸もしくはGlyCAM-1などのL-セ렉チン結合基質との結合活性を利用することにより、L-セ렉チンの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質と、シアルルイス酸もしくはGlyCAM-1などのL-セ렉チン結合基質およびL-セ렉チンを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させたL-セ렉チン結合基質のL-セ렉チンとの結合活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照L-セ렉チン結合基質のL-セ렉チンとの結合活性と比較する工程、

40

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記L-セ렉チン結合基質のL-セ렉チンとの結合を抑制する被験物質を選択する工程。

【0243】

ここでL-セ렉チンのシアルルイスXとの結合活性は、例えば特開平11-236394に記載の方法を参考にして測定することができる。すなわち、シアルルイスX(ナフトアミドSLeXポリマー)をプレートに固定し、L-セ렉チン/Igキメラ、検出用二次抗体を入れてインキュベートし、結合を測定する。既にL-セ렉チンの阻害剤として報告されているグリチルリチンをコントロールとして用いると良い。L-セ렉チン/Igキメラタンパクは、L-セ렉チンと免疫グロブリン(Ig)からなるキメラ遺伝子を構築し、ヒト腎由来細胞株293細胞に導入し、培養上清をプロテインAカラム(フ

50

アルマシア社製)にかけることで得ることができる。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した場合の両者の結合量が、被験物質を添加しない場合の結合量に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

また、L-セレクチンとそのリガンドであるGlyCAM-1との接着活性は、Biochemistry, 34, 14271-14277 (1995)を参考にして測定することができる。さらに、前記I.「受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング」に記載の方法により行うこともできる。

【0244】

(11) EGFL6の機能(活性)に基づくスクリーニング方法

EGF様リピートモチーフはEGF(Epidermal Growth Factor; 上皮細胞成長因子)をはじめ、細胞の生理学的な過程を調節する様々な蛋白質に含まれ、スーパーファミリーを形成している。30から40アミノ酸配列の中にいくつかの保存されたシステイン残基とグリシン残基をもつことを特徴とする。EGF様リピートモチーフを持つファミリーメンバーは、基本的に分泌されるか、もしくは細胞表面に位置しており、セルサイクルや増殖、発達の過程の調節を行うものが多い。Yeungらはハイスループットハイブリダイゼーションアプローチ法によってEGF様リピートモチーフを持つ新規蛋白質(EGFL6と命名)をコードする遺伝子を単離した。EGFL6はEGF様リピートモチーフの他に、シグナルペプチド(分泌蛋白質であることを意味する)およびインテグリンアソシエーションモチーフなどを持つ。成人の正常組織では発現しておらず、胎児や癌組織で発現していることがわかっている(Yeung, G.ら、Genomics, 62, 304-307, 1999)。該EGFL6の有する細胞増殖活性に基づいて、EGFL6の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0245】

▲1▼EGFL6の細胞増殖活性

EGFL6の有する細胞増殖活性を利用することにより、EGFL6の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

- (a) 被験物質と、EGFL6反応性細胞(繊維芽細胞もしくは小腸上皮細胞など)およびEGFL6を接触させる工程、
- (b) 被験物質を接触させた細胞のEGFL6による増殖活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞のEGFL6による増殖活性と比較する工程、
- (c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞のEGFL6による増殖活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0246】

ここでEGFL6の細胞増殖活性は、例えば特開平7-196527に記載の方法を参考にして測定することができる。すなわち、マウス線維芽細胞Swiss3T3またはラット小腸上皮細胞IEC18(共にAmerican Type Culture Collectionから購入)などにEGFL6を添加し、増殖を $[^3\text{H}]$ チミジン(アマシャム社)の取り込みなどによって測定する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した細胞の増殖活性が、被験物質を添加しない細胞の増殖活性に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0247】

(12) IDOの機能(活性)に基づくスクリーニング方法

IDO(インドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ、EC 1.13.11.17)は、生体内においてL-トリプトファンの異化作用を担う。トリプトファンはインドール環が開かれたN-フォルミルキヌレニンに分解される。IFN- γ によって発現が誘導され、IFN- γ の抗細胞内ウイルス作用や、抗細胞増殖作用は、IDOによる必須アミノ酸であるトリプトファンの分解によるものと考えられている(Dai, W.ら、Bio 50

chem. Biophys. Res. Commun., 168, 1-8, 1990)。従って、IDOの公知の性質に基づいて、IDOの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0248】

▲1▼トリプトファン分解活性

IDOの有するトリプトファン分解活性を利用することにより、IDOの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

- (a) 被験物質と、L-トリプトファンおよびIDOを水溶液中で接触させる工程、
- (b) 被験物質を接触させた水溶液のインドールアミン分解活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照水溶液のインドールアミン分解活性と比較する工程、
- (c) (b)の比較結果に基づいて、上記水溶液のインドールアミン分解活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0249】

ここでトリプトファン分解活性は、例えばCarlin, J. M.ら, J. Interferon Res., 9, 329-337, 1989の方法を参考にして測定することができる。すなわち、単球細胞をPeripheral blood mononuclear cellより調製し、10-14日培養してマクロファージとして成熟させる。さらにIFN- γ に暴露し、IDOを誘導した後、トリプトファン、[5-³H]トリプトファンを添加する。インキュベートした後の培養上清(-20℃にて保存可能)について、トリプトファンの分解の程度を調べる。上清よりC18カラムを用いた逆相HPLCにてL-トリプトファン、分解物であるN-フォルミルキヌレニンもしくはキヌレニンを分画し、各画分の放射活性をシンチレーションカウンターにて計測する。自然分解量を細胞非存在下の培養上清より同様に測定して差し引き、細胞によるトリプトファンの分解量をIDO活性として算出する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した場合のトリプトファン分解量が、被験物質を添加しない場合のトリプトファン分解量に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0250】

なお、プラセンタからの酵素の調製法および酵素活性の測定法として、Kudo, Y.ら, Biochimica et Biophysica Acta, 1500, 119-124, 2000の方法を参考とすることもできる。

【0251】

(13) IL-8の機能(活性)に基づくスクリーニング方法

IL-8は、LPS刺激ヒト末梢血単球培養上清から好中球の走化能を亢進させる因子として精製、クローニングされた。IL-8は、細菌、ウイルス由来成分、重金属、サイトカイン(IL-1、TNF- α)などの炎症性起因物質の刺激により単球、Large granular lymphocytes、血管内皮細胞、繊維芽細胞、ケラチノサイト、肝実質細胞、消化器癌細胞など多くの細胞から産生される。IL-8はケモカインのCXCサブファミリーに属し、その受容体はCXCR1およびCXCR2であることが知られている。IL-8は急性炎症での好中球による組織破壊にかかわっていることが明らかになっている。またin vitroにおいて、好中球の走化性のみでなく、好塩基球・T細胞に対する遊走活性、骨髄より末梢血への好中球の動員、好中球活性化(細胞内リソソーム酵素の放出、ロイコトリエンB4、活性酸素の産生誘導など)、LFA-1などの接着分子発現亢進、好中球の血管内皮細胞への接着増強など、多彩な作用を示す(橋本ら、Bio Science新用語ライブラリー 免疫 第2版、羊土社、186-187)。従って、IL-8の公知の性質に基づいて、IL-8の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0252】

▲1▼IL-8とCXCR1・CXCR2との結合活性

IL-8とCXCR1・CXCR2との結合活性を利用することにより、IL-8の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む:

(a) 被験物質の存在下で、CXCR1及び/又はCXCR2とIL-8とを接触させる工程、

(b) CXCR1及び/又はCXCR2に対するIL-8の結合量を測定し、当該結合量を、被験物質非存在下でCXCR1及び/又はCXCR2とIL-8とを接触させることによって得られるCXCR1及び/又はCXCR2に対するIL-8の結合量(対照結合量)と比較する工程、及び

(c) 上記(b)の結果に基づいて、対照結合量に比して結合量を低下させる被験物質を選択する工程。

10

【0253】

当該スクリーニングは、前記I.「受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング」に記載の方法により行うことができる。ここでCXCR1及び/又はCXCR2としては、CXCR1及び/又はCXCR2を発現する細胞又はその細胞膜画分を用いることが好ましく、具体的には、ヒトTHP-1細胞(単球由来細胞株、ATCC No. TIB-202)や、CXCR1の遺伝子(GenBank Acc. No. NM_000634)及び/又はCXCR2の遺伝子(GenBank Acc. No. NM_001557)を導入した形質転換細胞を挙げることができる。

20

【0254】**▲2▼好中球遊走活性**

IL-8の有する好中球遊走活性を利用することにより、IL-8の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む:

(a) 被験物質と、好中球およびIL-8を接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた上記細胞の遊走活性を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞の遊走活性と比較する工程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞の遊走活性を抑制する被験物質を選択する工程。

30

【0255】

ここで好中球の遊走活性測定は、Boyden法(J. Exp. Med. 115, 453-466, 1962)、又はその改良法(Immunology 10, 409-416, 1966, Am. J. Pathol. 64, 521-530, 1971, J. Immunol. Methods 46, 251-258, 1981, J. Clin. Pathol. 35, 182-185, 1982)を参考にして行うことができる。また最近になり、Gallinら(J. Immunol. 110, 233-240, 1973)やKuriharaら(J. Pharm. Dyn. 7, 747-754, 1984)はCr標識した好中球を用いてこれまで問題であったBoyden法の欠点をカバーできるケモタキシスアッセイ法を考案しており、この手法を用いて行うこともできる。また、Watanabeら(Japan. J. Pharmacol., 39, 102-104, 1985, J. Pharmacol. Methods, 22, 13-18, 1989)はマルチウエルタイプのボイデンチェンバーを考案し、これを用いて多数のサンプルの好中球走化性を測定することもできる。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した場合の好中球遊走活性が、被験物質を添加しない場合の好中球遊走活性に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

40

【0256】**▲3▼ライソザイム酵素または活性酵素産生活性**

IL-8により活性化された好中球は脱顆粒を起こし、エラスターゼ、カテプシンG、ミエロパーオキシダーゼ、βグルクロニダーゼ、コラゲナーゼ、Type IVゼラチナ

50

ーゼなどの酵素を放出したり、活性酸素を放出することが知られている。この放出されたライソザイム酵素や活性酵素を測定することにより、IL-8の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質と、ライソザイム酵素及び／又は活性酸素産生可能な細胞およびIL-8を接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた上記細胞のライソザイム酵素又は活性酵素産生量を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞のライソザイム酵素又は活性酵素産生量と比較する工程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞のライソザイム酵素又は活性酵素産生量を抑制する被験物質を選択する工程。 10

【0257】

ここでライソザイム酵素又は活性酵素産生量の測定は、例えば Grykiewicz, G. ら、J. Biol. Chem., 260, 3440 (1985)、又は Peveri, P. ら、J. Exp. Med., 167, 1547 (1988) 等に記載の方法を参考にして行うことができる。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した場合のライソザイム酵素又は活性酵素産生量が、被験物質を添加しない場合のライソザイム酵素又は活性酵素産生量に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0258】

(14) CD11cの機能(活性)に基づくスクリーニング方法

CD11c(別名インテグリン α -X)についてはNCBIのOMIMデータベースに記載されている(エントリーナンバー151510)。CD11cは、白血球表面抗原(若しくは白血球表面接着分子) p150, 95の α サブユニットであり、血小板糖タンパクI1b/I1a、ビトロネクチン受容体、フィブロネクチン受容体と高い相同性を有する。CD11cは、化学的誘引物質等により刺激された多形核白血球(PMN)が内皮細胞に接着する際に機能する分子であることが知られている(Stacker, S. A. ら、J. Immunol., 146, 648-655, 1991)。従って、CD11cの公知の性質に基づいて、CD11cの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。 20

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

【0259】

▲1▼内皮細胞との接着活性

CD11cの有する内皮細胞との接着活性を利用することにより、CD11cの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質と、内皮細胞およびCD11cを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた場合のCD11cの内皮細胞への接着活性を測定し、該接着活性を被験物質を接触させない場合の内皮細胞への接着活性と比較する工程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記CD11cの内皮細胞への接着活性を抑制する被験物質を選択する工程。 40

【0260】

ここで用いるCD11cとしては、CD11cタンパク質、または当該CD11cを発現可能な細胞を挙げることができる。

またCD11cと内皮細胞との接着活性は、例えば Stacker, S. A. ら、J. Immunol., 146, 648-655, 1991に記載の方法を参考にして行うことができる。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加した場合のCD11cと内皮細胞との接着活性が、被験物質を添加しない場合の内皮細胞との接着活性に比して減少するか否かを指標にして行うことができる。

【0261】

(15) TLR2の機能(活性)に基づくスクリーニング方法

TLR2 (Toll-like receptor 2) については緒方ら、Bio Science 新用語ライブラリー 免疫 第2版、羊土社、236-237に記載されている。すなわち、ハエの免疫機構における病原体センサーであるTollのヒトホモログとして見つかったレセプター型の膜蛋白である。グラム陽性菌、マイコプラズマ、マイコバクテリアを認識し、Myd88、IRAK、TRAF6、NIK、IKK等の細胞内シグナル伝達分子を活性化し、最終的にNF- κ B転写因子の活性化を経てさまざまな感染防御作用を惹起すると考えられている。従って、TLR2の公知の性質に基づいて、TLR2の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

具体的には、以下のスクリーニング方法を例示することができる。

10

【0262】

▲1▼TLR2とバクテリア由来のリポタンパク質/ペプチドグリカンとの結合活性

TLR2がバクテリア由来のリポタンパク質やペプチドグリカンと結合する性質を利用することにより、TLR2の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質の存在下で、TLR2とバクテリア由来のリポタンパク質又はペプチドグリカンとを接触させる工程、

(b) TLR2に対するバクテリア由来のリポタンパク質又はペプチドグリカンの結合量を測定し、当該結合量を、被験物質非存在下でTLR2とバクテリア由来のリポタンパク質又はペプチドグリカンとを接触させることによって得られるTLR2に対するバクテリア由来のリポタンパク質又はペプチドグリカンの結合量(対照結合量)と比較する工程、及び

20

(c) 上記(b)の結果に基づいて、対照結合量に比して結合量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0263】

当該スクリーニングは、前記1.「受容体結合阻害活性に基づくスクリーニング」に記載の方法により行うことができる。ここでTLR2としては、TLR2を発現する細胞又はその細胞膜画分を用いることが好ましく、具体的には、単球、マクロファージや、TLR2の遺伝子(GenBank Acc. No. U88878)を導入した形質転換細胞を挙げることができる。

30

【0264】

▲2▼細胞活性化活性

TLR2が発現している単球、マクロファージを細菌外膜成分などで刺激することで細胞の増殖、活性化、炎症物質やサイトカイン、一酸化窒素の産生が起こることが知られている。従って、該活性を利用することにより、TLR2の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質と、TLR2を発現しておりかつサイトカインもしくは一酸化窒素産生可能な細胞、および細菌または細菌由来成分とを接触させる工程、

40

(b) 被験物質を接触させた上記細胞のサイトカインもしくは一酸化窒素産生量を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞のサイトカインもしくは一酸化窒素産生量と比較する工程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞のサイトカインもしくは一酸化窒素産生量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0265】

ここで用いられる「TLRを発現しておりかつサイトカインもしくは一酸化窒素産生可能な細胞」としては、単球やマクロファージが挙げられる。また「細菌または細菌由来成分」としては、バクテリア由来のリポタンパク質やペプチドグリカンが挙げられる。また測定対象である「サイトカイン」としては、炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-

50

6、IL-12、IFN- γ などが挙げられる。当該サイトカイン産生量の測定は、例えば特開2002-45086に記載の方法を参考にすることができる。また測定対象である「一酸化窒素」については、特開2002-45086に記載の方法を参考に、代謝物である亜硝酸イオンをグリース法により測定することができる。

【0266】

▲3▼TLR2のシグナル活性化

TLR2にリガンドが結合することによって、MyD88、IRAK、TRAF6、NIK、IKK等の細胞内シグナル伝達分子が活性化され、最終的にNF- κ B転写因子が活性化されることが知られている。従ってこれらの活性化を検出することによって、またはNF- κ Bによって誘導される標的遺伝子の発現を検出することによっても、TLR2の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)及び(c)を含む：

(a) 被験物質と、TLR2発現細胞、および細菌または細菌由来成分とを接触させる工程、

(b) 被験物質を接触させた上記細胞のIRAKよりMAPキナーゼを経てNF- κ Bにいたるシグナル経路の活性化を測定し、該活性を被験物質を接触させない対照細胞のIRAKよりMAPキナーゼを経てNF- κ Bにいたるシグナル経路の活性化の程度と比較する工程、

(c) (b)の比較結果に基づいて、上記細胞のIRAKよりMAPキナーゼを経てNF- κ Bにいたるシグナル経路の活性化を抑制する被験物質を選択する工程。

【0267】

ここで「TLR2発現細胞」とは、単球やマクロファージが挙げられる。また「細菌および細菌由来成分」としては、バクテリア由来のリポタンパク質やペプチドグリカンが挙げられる。また「IRAKよりMAPキナーゼを経てNF- κ Bにいたるシグナル経路」とは、具体的にはMyD88→IRAK→TRAF→NIK→IKK→NF- κ Bという一連のシグナル伝達経路を指す。当該シグナル伝達に関わる各因子の活性化の測定は、例えばBio Science新用語ライブラリー 免疫 第2版、羊土社、236-237、134-137、Shuto, T.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 98, 8774-8779, 2001、Yang, R. B.ら、J. Immunol., 163, 639-643, 1999等に記載の方法を参考にして行うことができる。

【0268】

かくして選抜取得される被験物質は、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する薬物の有力な候補となる。

【0269】

上記(3-1)～(3-3)に記載する本発明のスクリーニング方法によって選別された候補物質は、さらにIBDのモデル動物である以下の(1)～(3)の動物：(1)自然発症IBDモデル(C3H/HeJBirマウス、Cotton top tamarins等)、(2)化学物質誘発モデル(ジニトロクロロベンゼン誘発モデル(ラット)、酢酸モデル(ラット)、トリニトロスルホン酸誘発モデル(マウス、ラット、ウサギ)、デキストラン硫酸誘発モデル(マウス、ラット、ハムスター)、カラゲナン誘発モデル(ラット、モルモット)、インドメタシン誘発モデル(ラット)等)、(3)トランスジェニック、ミュータント(IL-2ノックアウトマウス、IL-10ノックアウトマウス、TCRノックアウトマウス等)、または(4)移入モデル(CD45RBhi移入SCIDマウス等)、を用いた薬効試験、安全性試験、さらにIBD患者への臨床試験に供してもよく、これらの試験を実施することによって、より実用的なIBDの改善または治療薬を取得することができる。このようにして選別された物質は、さらにその構造解析結果に基づいて、化学的合成、生物学的合成(発酵)または遺伝子学的操作によって、工業的に製造することができる。

【0270】

なお、上記(3-1)～(3-3)に記載するスクリーニング方法は、IBDの改善または治療薬の候補物質を選別するのみならず、IBDの既存の若しくは新規な改善または治療薬(候補薬)が、FcγR I I I a遺伝子、FcγR I I I b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現を抑制するか否か、あるいはFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現若しくは機能・活性を抑制するか否かを評価、確認するためにも用いることができる。すなわち本発明のスクリーニング方法の範疇には、候補物質の探索のみならず、この

10

【0271】

(4) IBDの改善・治療剤

本発明は、IBDの改善・治療剤を提供するものである。

本発明はFcγR I I I a遺伝子、FcγR I I I b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子、TLR2遺伝子及びこれらの遺伝子によりコードされるタンパク質が、IBDと関係しているという新たな知見から、これら遺伝子の発現を抑制する物質、あるいは、これら遺伝子によりコードされるタンパク質の発現若しくは機能(活性)を抑制する物質が、上記疾患の改善または治療に有効であるという考えに基づくものである。すなわち、本発明のIBDの改善・治療剤は、FcγR I I I a遺伝子、FcγR I I I b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現を抑制する物質、あるいはFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現若しくは機能(活性)を抑制する物質を有効成分とするものである。

20

30

【0272】

当該有効成分となるFcγR I I I a遺伝子、FcγR I I I b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現抑制物質、あるいはFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現若しくは機能(活性)抑制物質は、上記のスクリーニング方法を利用して選別されたもののみならず、選別された物質に関する情報に基づいて常法に従って工業的に製造されたものであってもよい。

40

【0273】

FcγR I I I a遺伝子、FcγR I I I b遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG I I I 遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかの発現抑制物質、あるいはFcγR I I I a、FcγR I I I b、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ 3、HM74、REG I I I、LPAP、Mip-1β、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cおよびTLR2のいずれかの発現若しくは機能(活性)

50

抑制物質は、そのままもしくは自体公知の薬学的に許容される担体（賦形剤、増量剤、結合剤、滑沢剤などが含まれる）や慣用の添加剤などと混合して医薬組成物として調製することができる。当該医薬組成物は、調製する形態（錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤などの経口投与剤；注射剤、点滴剤、外用剤、坐剤などの非経口投与剤）等に応じて経口投与または非経口投与することができる。また投与量は、有効成分の種類、投与経路、投与対象または患者の年齢、体重、症状などによって異なり一概に規定できないが、通常、1日投与用量として、数mg～2g程度、好ましくは数十mg程度を、1日1～数回にわけて投与することができる。

【0274】

また、上記の物質がDNAによりコードされるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。更に、上記有効成分物質がFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、レーセクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子のいずれかに対するアンチセンスヌクレオチドの場合は、そのまましくは遺伝子治療用ベクターにこれを組込むことにより、遺伝子治療を行うこともできる。これらの場合も、遺伝子治療用組成物の投与量、投与方法は患者の体重、年齢、症状などにより変動し、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0275】

上記アンチセンスヌクレオチドを利用する遺伝子治療につき詳述すれば、該遺伝子治療は、通常のこの種の遺伝子治療と同様にして、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体を直接患者の体内に投与することにより目的遺伝子の発現を制御する方法、もしくはアンチセンスRNAを患者の標的細胞に導入することにより該細胞による目的遺伝子の発現を制御する方法により実施できる。

【0276】

ここで「アンチセンスヌクレオチド」には、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、レーセクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子またはTLR2遺伝子の少なくとも8塩基以上の部分に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスRNA、アンチセンスDNAなどが含まれる。具体的には、配列番号：1～14及び29のいずれかに記載の塩基配列の少なくとも8塩基以上の部分に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスRNA、アンチセンスDNAなどが含まれる。

【0277】

また、その化学修飾体には、例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホトリエステル、アルキルホスホナート、アルキルホスホアミデートなどの、細胞内への移行性または細胞内での安定性を高め得る誘導体（"Antisense RNA and DNA" WILEY-LISS刊、1992年、pp. 1-50、J. Med. Chem. 36, 1923-1937 (1993)）が含まれる。これらは常法に従い合成することができる。

【0278】

アンチセンスヌクレオチドまたはその化学的修飾体は、細胞内でセンス鎖mRNAに結合して、目的遺伝子の発現、即ちFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、レーセクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子またはTLR2遺伝子の発現を抑制することができ、かくしてFcγRIIIa、FcγRIIIb、Mig、NRG-2、ヘキソキナーゼ3、HM74、REGIII、LPAP、Mip-1

β 、L-セレクチン、EGFL6、IDO、IL-8、CD11cまたはTLR2の機能（活性）を抑制することができる。

【0279】

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体を直接生体内に投与する方法において、用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学修飾体は、好ましくは5-200塩基、さらに好ましくは8-25塩基、最も好ましくは12-25塩基の長さを有するものとすればよい。その投与に当たり、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体は、通常慣用される安定化剤、緩衝液、溶媒などを用いて製剤化され得る。

アンチセンスRNAを患者の標的細胞に導入する方法において、用いられるアンチセンスRNAは、好ましくは100塩基以上、より好ましくは300塩基以上、さらに好ましくは500塩基以上の長さを有するものとすればよい。また、この方法は、生体内の細胞にアンチセンス遺伝子を導入する*in vivo*法および一旦体外に取り出した細胞にアンチセンス遺伝子を導入し、該細胞を体内に戻す*ex vivo*法を包含する（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36（1）、23-48（1994）、実験医学増刊、12（15）、全頁（1994）など参照）。この内では*in vivo*法が好ましく、これには、ウイルス的導入法（組換えウイルスを用いる方法）と非ウイルス的導入法がある（前記各文献参照）。

【0280】

上記組換えウイルスを用いる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルスなどのウイルスゲノムにアンチセンスヌクレオチドを組込んで生体内に導入する方法が挙げられる。この中では、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルスなどを用いる方法が特に好ましい。非ウイルス的導入法としては、リボソーム法、リボフェクチン法などが挙げられ、特にリボソーム法が好ましい。他の非ウイルス的導入法としては、例えばマイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法なども挙げられる。

【0281】

遺伝子治療用製剤組成物は、上述したアンチセンスヌクレオチドまたはその化学修飾体、これらを含む組換えウイルスおよびこれらウイルスが導入された感染細胞などを有効成分とするものである。該組成物の患者への投与形態、投与経路などは、治療目的とする疾患、症状などに応じて適宜決定できる。例えば注射剤などの適当な投与形態で、静脈、動脈、皮下、筋肉内などに投与することができ、また患者の疾患対象部位に直接投与、導入することもできる。*in vivo*法を採用する場合、遺伝子治療用組成物は、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子またはTLR2遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含む注射剤などの投与形態の他に、例えばFcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子またはTLR2遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含有するウイルスベクターをリボソームまたは膜融合リボソームに包埋した形態（センダイウイルス（HVJ）-リボソームなど）とすることができる。これらのリボソーム製剤形態には、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などが含まれる。また、遺伝子治療用組成物は、上記FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子またはTLR2遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含有するベクターを導入されたウイルスで感染され

10

20

30

40

50

た細胞培養液の形態とすることもできる。これら各種形態の製剤中の有効成分の投与量は、治療目的である疾患の程度、患者の年齢、体重などにより適宜調節することができる。通常、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子またはTLR2遺伝子に対するアンチセンスヌクレオチドの場合は、患者成人1人当たり約0.0001-100mg、好ましくは約0.001-10mgが数日ないし数カ月に1回投与される量とすればよい。アンチセンスヌクレオチドを含むレトロウイルスベクターの場合は、レトロウイルス力価として、1日患者体重1kg当たり約 1×10^3 pfu- 1×10^{15} pfuとなる量範囲から選ぶことができる。アンチセンスヌクレオチドを導入した細胞の場合は、 1×10^4 細胞/body- 1×10^{15} 細胞/body程度を投与すればよい。

【0282】

【実施例】

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。しかし、本発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

【0283】

実施例1 ヒト組織サンプルからトータルRNAの調製

ヒトの正常な結腸組織117サンプル、潰瘍性大腸炎患者の結腸病変組織3サンプル、およびクローン病患者の結腸病変組織2サンプルから、それぞれ常法に従いトータルRNAを調製した。

【0284】

さらにヒトの右心房正常組織151サンプル、右心室正常組織140サンプル、左心房正常組織132サンプル、子宮筋層正常組織90サンプル、子宮頸部正常組織90サンプル、胸正常組織84サンプル、肺正常組織77サンプル、胸腺正常組織67サンプル、卵巣正常組織62サンプル、腎臓正常組織61サンプル、皮膚正常組織56サンプル、小腸正常組織48サンプル、直腸正常組織46サンプル、肝臓正常組織42サンプル、白血球正常組織37サンプル、胃正常組織37サンプル、子宮正常組織32サンプル、子宮内膜正常組織31サンプル、筋肉正常組織30サンプル、前立腺正常組織28サンプル、脾臓正常組織26サンプル、脂肪組織正常組織25サンプル、膵臓正常組織20サンプル、食道正常組織20サンプル、十二指腸正常組織17サンプル、甲状腺正常組織13サンプル、卵管正常組織13サンプル、リンパ節正常組織11サンプル、静脈正常組織8サンプル、軟組織正常組織7サンプル、前頭葉皮質正常組織7サンプル、海馬正常組織6サンプル、網正常組織5サンプル、左心室正常組織5サンプル、喉頭正常組織5サンプル、心臓正常組織5サンプル、側頭葉皮質正常組織5サンプル、骨正常組織5サンプル、副腎正常組織5サンプル、精囊正常組織4サンプル、小脳正常組織4サンプルおよび膀胱正常組織4サンプルより、それぞれ常法に従いトータルRNAを調製した。

【0285】

実施例2 DNAチップ解析

実施例1に示したサンプルより調製したtotal RNAを用いて、DNAチップ解析を行った。なお、DNAチップ解析はAffymetrix社Gene Chip Human Genome U95セットを用いて行った。具体的には、解析は、(1) total RNAからcDNAの調製、(2) 該cDNAからラベル化cRNAの調製、(3) ラベル化cRNAのフラグメント化、(4) フラグメント化cRNAとプローブアレイとのハイブリダイズ、(5) プローブアレイの染色、(6) プローブアレイのスキャン、及び(7) 遺伝子発現解析、の手順で行った。

【0286】

(1) total RNAからcDNAの調製

実施例1で得られた各total RNA 10μgとT7-(dT)24プライマー(Amersham社製) 100pmolを含む11μLの混合液を、70℃、10分間加

10

20

30

40

50

熱した後、氷上で冷却した。冷却後、SuperScript Choice System for cDNA Synthesis (Gibco-BRL社製)に含まれる5×First Strand cDNA Buffer 4 μL、該キットに含まれる0.1 M DTT (dithiothreitol) 2 μL、該キットに含まれる10 mM dNTP Mix 1 μLを添加し、42℃で2分間加熱した。更に、該キットに含まれるSuperScript II RT 2 μL (400 U)を添加し、42℃で1時間加熱した後、氷上で冷却した。冷却後、DEPC処理水(ナカライテスク社製)滅菌蒸留水91 μL、該キットに含まれる5×Second Strand Reaction Buffer 30 μL、10 mM dNTP Mix 3 μL、該キットに含まれるE. coli DNA Ligase 1 μL (10 U)、該キットに含まれるE. coli DNA Polymerase I 4 μL (40 U)、該キットに含まれるE. coli RNase H 1 μL (2 U)を添加し、16℃で2時間反応させた。次いで、該キットに含まれるT4 DNA Polymerase 2 μL (10 U)を加え、16℃で5分間反応させた後、0.5 M EDTA 10 μLを添加した。次いで、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液(ニッポンジーン社製) 162 μLを添加し、混合した。該混合液を、予め室温、14,000 rpm、30秒間遠心分離しておいたPhase Lock Gel Light (エッペンドルフ社製)に移し、室温で14,000 rpm、2分間遠心分離した後、145 μLの水層をエッペンドルフチューブに移した。得られた溶液に、7.5 M 酢酸アンモニウム溶液72.5 μL、エタノール362.5 μLを加えて混合した後、4℃で14,000 rpm、20分間遠心分離した。遠心分離後、上清を捨て、作製したcDNAを含むペレットを得た。その後、該ペレットに80%エタノール0.5 mLを添加し、4℃で14,000 rpm、5分間遠心分離した後、上清を捨てた。再度同様の操作を行った後、該ペレットを乾燥させ、DEPC処理水12 μLに溶解した。以上の操作により実施例1で調製した各トータルRNAから、各cDNAを取得した。

【0287】

(2) cDNAからラベル化cRNAの調製

各cDNA溶液5 μLに、DEPC処理水17 μL、BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (ENZO社製)に含まれる10×HY Reaction Buffer 4 μL、該キットに含まれる10×Biotin Labeled Ribonucleotides 4 μL、該キットに含まれる10×DTT 4 μL、該キットに含まれる10×RNase Inhibitor Mix 4 μL、該キットに含まれる20×T7 RNA Polymerase 2 μLを混合し、37℃で5時間反応させて、ラベル化cRNAを調製した。反応後、該反応液にDEPC処理水60 μLを加えたのち、RNeasy Mini Kit (G I A G E N社製)を用いて添付プロトコルに従い、調製したラベル化cRNAを精製した。

【0288】

(3) ラベル化cRNAのフラグメント化

各ラベル化cRNA 20 μgを含む溶液に、5×Fragmentation Buffer (200 mM トリス-酢酸 pH 8.1 (Sigma社製)、500 mM 酢酸カリウム (Sigma社製)、150 mM 酢酸マグネシウム (Sigma社製)) 8 μLを加えた反応液40 μLを、94℃で35分間加熱した後、氷中に置いた。これによって、ラベル化cRNAをフラグメント化した。

【0289】

(4) フラグメント化cRNAとプローブアレイとのハイブリダイズ

各フラグメント化cRNA 40 μLに、5 nM Control Oligo B2 (Amersham社製) 4 μL、100×Control cRNA Cocktail 4 μL、Herring sperm DNA (Promega社製) 40 μg、Acetylated BSA (Gibco-BRL社製) 200 μg、2×MES Hyb

ridization Buffer (200mM MES、2M $[Na^+]$ 、40mM EDTA、0.02% Tween20 (Pierce社製)、pH6.5~6.7) 200 μ L、及びDEPC処理水144 μ Lを混合し、400 μ Lのハイブリカクテルを得た。得られた各ハイブリカクテルを99℃で5分間加熱し、更に45℃で5分間加熱した。加熱後、室温で14,000rpm、5分間遠心分離し、ハイブリカクテル上清を得た。

【0290】

一方、1×MESハイブリダイゼーションバッファーで満たしたHuman genome U95プローブアレイ (Affymetrix社製) を、ハイブリオープン内で、45℃、60rpmで10分間回転させた後、1×MESハイブリダイゼーションバッファーを除去してプローブアレイを調製した。上記で得られたハイブリカクテル上清200 μ Lを該プローブアレイにそれぞれ添加し、ハイブリオープン内で45℃、60rpmで16時間回転させ、フラグメント化cRNAとハイブリダイズしたプローブアレイを得た。

【0291】

(5) プローブアレイの染色

上記で得られたハイブリダイズ済みプローブアレイそれぞれからハイブリカクテルを回収除去した後、Non-Stringent Wash Buffer (6×SSPE (20×SSPE (ナカライテスク社製) を希釈)、0.01% Tween20、0.005% Antifoam0-30 (Sigma社製)) で満たした。次にNon-Stringent Wash BufferおよびStringent Wash Buffer (100mM MES、0.1M NaCl、0.01% Tween20) をセットしたGeneChip Fluidics Station 400 (Affymetrix社製) の所定の位置にフラグメント化cRNAとハイブリダイズしたプローブアレイを装着した。その後染色プロトコールEuKGE-WS2に従って、1次染色液 (10 μ g/mL Streptavidin Phycocerythrin (SAPE) (Molecular Probe社製)、2mg/mL Acetylated BSA、100mM MES、1M NaCl (Ambion社製)、0.05% Tween20、0.005% Antifoam0-30)、2次染色液 (100 μ g/mL Goat IgG (Sigma社製)、3 μ g/mL Biotinylated Anti-Streptavidin antibody (Vector Laboratories社製)、2mg/mL Acetylated BSA、100mM MES、1M NaCl、0.05% Tween20、0.005% Antifoam0-30) により染色した。

【0292】

(6) プローブアレイのスキャン、及び (7) 遺伝子発現量解析

染色した各プローブアレイをHP GeneArray Scanner (Affymetrix社製) に供し、染色パターンを読み取った。染色パターンをもとにGeneChip Workstation System (Affymetrix社製) によってプローブアレイ上の遺伝子の発現を解析した。次に、解析プロトコールに従ってNormalizationを行ったのち、各サンプルにおける各プローブ (各遺伝子) の発現量 (average difference) を算出した。同一のプローブにつき、サンプルの種類ごとに遺伝子発現量の平均値を求め、さらに各サンプル種類間における発現量の変化率を求めた。

【0293】

実施例3 発現変動解析

潰瘍性大腸炎患者およびクローン病患者の結腸病変組織にて発現増加している遺伝子を、以下のようにして選択した。

【0294】

実施例2で行ったDNAチップ解析による遺伝子発現の解析結果から、結腸正常組織に比べて潰瘍性大腸炎患者の結腸病変組織で発現が増加しているプローブセットのうち、最も

10

20

30

40

50

変化率の大きいプローブから400番目までを選択した。また、結腸正常組織に比べてクローン病患者の結腸病変組織で発現が増加しているプローブセットについても変化率の大きいものから400番目までを選択した。両グループで共通に選抜したプローブにつき解析し、共通に発現増加するプローブとして142プローブを選択した。

【0295】

次にこれら142プローブの中から、より病態との関連性の高いプローブを選択する目的で、IBD病変関連組織（大腸を含む消化管）およびIBDの発症機構に関与する免疫系組織以外の組織において発現量の低いプローブを選択した。すなわち、これら142プローブについて、結腸正常組織を含む43種類の正常組織における発現量をDNAチップの結果より解析し、消化管もしくは免疫系組織以外の組織において発現量の低いプローブを選択した。次に、これら選択されたプローブの対応遺伝子を調べ、これらの遺伝子の中から、さらに薬剤ターゲットとなる機能を有する遺伝子を選別した。

10

その結果、FcγRIIIa遺伝子、FcγRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子、及びTLR2遺伝子の、計15遺伝子が選択された。

【0296】

【表1】

塩基配列配 列番号	アミノ酸配 列配列番号	Human U95 プローブ名	遺伝子名	変動倍率 (潰瘍性 大腸炎)	変動倍率 (クロー ン病)	Acc No
29	30	37200_at	FcγR IIIa	7.0	4.9	NM_000569
1	15	31499_s_a t	FcγR IIb	7.5	4.6	NM_000570
2	16	37219_at	Mig	7.6	10.4	S60728
3	17	35090_g_a t	NRG-2	4.2	4.9	AB005060
4	18	36372_at	ヘキソキナーゼ 3	7.1	4.8	U51333
5	19	34951_at	HM74	4.1	5.6	D10923
6	20	39946_at	REG III	8.5	25.2	NM_002580
7	21	32070_at	LPAP	6.0	4.2	X81422
8	22	36674_at	Mip-1β	4.4	6.6	J04130
9	23	245_at	L-セ렉チン	6.7	4.7	NM_000655
10	24	53787_at	EGFL6	3.9	7.2	NM_015507
11	25	70099_g_a t	IDO	4.4	13.2	NM_002164
12	26	1369_s_at	IL-8	32.4	5.7	NM_000584
13	27	52349_s_a t	CD11c	5.8	6.9	NM_000887
14	28	40310_at	TLR2	6.5	4.7	U88878

10

20

30

【0297】

表中、Human U95プローブ名は Human Genome U95 Chip
におけるプローブ名を示す。また表中 Acc Noは、GenBankデータベース
におけるアクセッション番号を示す。また表中、変動倍率は、Human Genome
U95 Chipで解析した結腸正常組織の遺伝子発現量を1とした場合における潰瘍
性大腸炎患者若しくはクローン病患者の結腸病変組織での遺伝子発現量を示す。また各遺
伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を示す後記配列表の配列番号も合わせて示す。

40

【0298】

選択された遺伝子の中には、既にIBDの治療薬開発のターゲットとなっているインター
ロイキン1β、マトリックスプロテアーゼ1、マトリックスプロテアーゼ9などが含まれ
ており、上記の選抜方法で確かにIBD患者特異的に発現が増加し、かつ治療薬のターゲ
ットとなる遺伝子が選抜されていることが明らかとなった。選択された遺伝子の中からこ
れら公知のターゲット遺伝子を除外したものが、表1に記載の15遺伝子である。

50

【0299】

以上のように、選別された前記15個の遺伝子は、正常な結腸組織と比較してIBD患者の結腸組織で特異的に発現上昇しており、また病態との関連性の高い遺伝子であった。従ってこれら15遺伝子およびその発現産物（タンパク質）は、IBDに関する疾患マーカーとして応用可能であると考えられた。また、これらの遺伝子またはその発現産物（タンパク質）を用いることによって、IBDを緩和、抑制する治療薬の候補薬をスクリーニングすることが可能であると考えられた。

【0300】

実施例4 FcγR IIIa遺伝子、FcγR IIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG IIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子、および／またはTLR2遺伝子発現抑制剤のスクリーニング

【0301】

Caco-2細胞（ヒト結腸腺癌由来、ATTC株番号HTB-37、大日本製薬株式会社）、HT-29細胞（ヒト結腸腺癌由来、ATTC株番号HTB-38、大日本製薬株式会社）、またはCOLO 205細胞（ヒト結腸腺癌由来、ATTC株番号CCL-222、大日本製薬株式会社）を、10% 不活性化牛胎児血清、2mMグルタミン、50IU/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシン含有Dulbecco's Modified Eagle培地を用い、37℃、CO₂濃度5%の条件下で培養する。計数したCaco-2細胞、HT-29細胞またはCOLO 205細胞を24穴組織培養プレートに0.6-1.2×10⁵ cells/cm²で播種し、37℃、CO₂濃度5%で培養する。これらの細胞に対して刺激剤（ホルボール12-ミリステート13アセテート、サイトカイン（Interferonγ、Tumor necrosis factor-α、Interleukin-1、Interleukin-6等）あるいはButyrate）の存在下で被験物質含有溶液（100 μM、10 μM、および1 μMの各濃度の被験物質を含む溶液）を添加する。ここで対照実験として、被験物質無添加の細胞についても同様の培養を行う（コントロール）。これらの各培養細胞より抽出したRNAを用いて実施例2に記載された方法で、FcγR IIIa遺伝子、FcγR IIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG IIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子、および／またはTLR2遺伝子の発現量を調べる。その発現量からコントロールと比べて、FcγR IIIa遺伝子、FcγR IIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ 3遺伝子、HM74遺伝子、REG IIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1β遺伝子、L-セレクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子、および／またはTLR2遺伝子の発現量が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上低下している培養系に添加した被験物質を、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する候補化合物として選択する。

【0302】

実施例5 FcγR IIIaの機能（活性）抑制剤のスクリーニング

Cassatella, M. A. ら、J. Exp. Med., 169, 549-567, 1989に記述されている方法を参考にFcγR IIIaによる細胞内カルシウム濃度増加活性を測定することができ、この測定系を用いてFcγR IIIaの機能（活性）を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

1 mM CaCl₂、5.6 mM glucose、20 mM Hepes、0.025% BSA 含有pH 7.4のHBSS（ギブコ社）溶液に、ヒト末梢血単核球細胞より精製したNK細胞を5×10⁶ cells/mlの濃度にて懸濁し、添加後濃度2 μMのfura-2/AM（カルビオケム社）を添加し、15分間、37℃にて振盪しながらインキュベートする。BSA、fura-2/AMを含まない上

10

20

30

40

50

記緩衝液（以降標準緩衝液と記述）にて5倍希釈した後、さらに30分間インキュベートする。細胞を洗浄し、 3×10^6 cells/ml にて再懸濁する。被験物質を添加し、 $5 \mu\text{g/ml}$ の3G8（MBL社）を添加した後、細胞内カルシウム濃度の変化を励起波長 340 nm、蛍光波長 505 nm にて測定する。

細胞内カルシウム濃度の増加が被験物質無添加群に比して10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する候補化合物として選択する。

【0303】

実施例6 FcγR I I I bの機能（活性）抑制剤のスクリーニング

細胞表面にFcγR I I I bを発現している細胞がIgGを貪食する作用を利用することにより、FcγR I I I bの機能（活性）を抑制する物質をスクリーニングすることができる。 10

FITCで標識した酵母を抗酵母抗体（Lew, D. P. ら、Nature, 315, 509-511, 1985 およびHed, J. ら、Immunology, 45, 727-736, 1982）とともにインキュベートしてFITC-IgG粒子を作製する。他方、ヒトから採血して精製した好中球（ 5×10^6 ）とFITC-IgG粒子（ 2.5×10^7 ）とを2.9 mlの緩衝液（組成 138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1.1 mM CaCl₂, 5 mM NaHCO₃, 100 μM EGTA, 5.5 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4）にて37℃、10分間インキュベートする。細胞外のFITC-IgG粒子はトリパンブルーでクエンチングし、細胞内に取り込まれたFITCの蛍光をモニターする（Lew, D. P. ら、Nature, 315, 509-511, 1985 およびHed, J. ら、Immunology, 45, 727-736, 1982）。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない細胞に比して被験物質を添加した細胞の、細胞内に取り込まれたFITCの蛍光量が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少していた系に添加した被験物質を、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する候補化合物として選択する。 20

【0304】

実施例7 Migの機能（活性）抑制剤のスクリーニング

Weng, Y. ら、J. Biol. Chem., 273, 18288-18291, 1998 およびDeMartino, J. A. ら、J. Biol. Chem., 269, 14446-14450, 1994を参考にMigによる細胞内カルシウム濃度増加活性を測定することができ、この測定系を用いてMigの機能（活性）を抑制する物質をスクリーニングすることができる。 30

ヒトT細胞もしくはCXCR3（GenBank Acc. No. NM_001504）を発現させたCHO細胞（ATCC No. CCL-61、大日本製薬） 2×10^6 cells/ml に対し $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIndo-1を添加、10 mM Hepes、5% FCSを含むRPMI 中にて45分37℃でインキュベートする。細胞を回収、洗浄し、再び $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIndo-1を含む上記組成培地にてさらに45分インキュベートする。細胞を回収し、 2.5×10^6 cells/ml の濃度にて10 mM Hepes、0.1% BSAを含むRPMI 中に懸濁し37℃に温めておく。被験物質を添加し、細胞内カルシウム濃度の変化を励起波長 365 nm、蛍光波長 405 nm および488 nm にて測定する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない細胞に比して被験物質を添加した細胞の細胞内カルシウム濃度の増加が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する候補化合物として選択する。 40

【0305】

実施例8 NRG-2の機能（活性）抑制剤のスクリーニング

Pignatelli, M. ら、J. Cell Science, 114, 41 50

17-4126, 2001の方法を参考にニューレグリンのERBB発現細胞増殖活性を測定することができ、この測定系を用いてNRG-2の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。MCF-7細胞(大日本製薬もしくはATCCより入手可能、ATCC Number HTB-22)を96ウェルプレートに1ウェルあたり7000細胞シードする。RPMI培地(10% FCS、1000 IU ペニシリン-ストربتマイシン、2 mM グルタミン含有)で24時間培養した後、無血清培地に交換し、被験物質とNRG-2(30 nM)を添加し、24時間培養する。 [³H] チミジン(0.5 μCi)を加え、さらに24時間培養する。細胞をハーベストし、洗浄後、 [³H] チミジンの取り込み量を固体シンチレーションカウンターにて測定する。NRG-2はCarrawayらの方法(Nature, 387, 512-516)にて調製する。すなわちNRG-2のEGF様ドメイン(アミノ酸配列246-314)とグルタチオン-S-トランスフェラーゼの融合蛋白質を、High Five細胞(昆虫細胞)にて発現させ、グルタチオン親和性カラムにて回収する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない細胞に比して被験物質を添加した細胞の [³H] チミジンの取り込みが10%、好ましくは30%、特に好ましくは50% 以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

10

【0306】

実施例9 ヘキソキナーゼ 3の機能(活性)抑制剤のスクリーニング

D-グルコース6-リン酸生成をグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、NADP共存下での340 nm 吸光度の増加で測定することによって、ヘキソキナーゼ3の酵素活性を測定することができ(生化学実験講座12 エネルギー代謝と生体酸化 上104-108)、この測定系を用いてヘキソキナーゼ3の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

20

ヒト溶血上清液50 μl、1.0 M Tris-塩酸緩衝液(pH 8.0)100 μl、0.1 M MgCl₂ 20 μl、2 mM NADP 100 μl、20 mMグルコース100 μl、20 mM ATP 100 μlを混合し、被験物質存在下および非存在下で20分間37℃にて保温し、340 nmの吸光度の増加を測定する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない場合の吸光度に比して被験物質を添加した場合の吸光度の増加が、10%、好ましくは30%、特に好ましくは50% 以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

30

【0307】

実施例10 HM74の機能(活性)抑制剤のスクリーニング

HM74の活性測定は、G蛋白共役型受容体がGDP存在下でGTPアナログであるGTPγSを結合する性質を利用して、以下のように行うことができる。

HM74の遺伝子(GenBank Acc. No. D10923)発現ベクターを作製し、CHO-K1細胞またはHEK293細胞に過剰発現させる。超遠心により細胞の膜画分を調製し、-80℃で保存する。1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 100 mM NaCl, 100 μM GDPを含む50 mM Tris-Cl(pH. 7.4)バッファーに10 μgの膜蛋白及び被験物質を混合して最終容量500 μlとし、30℃で30分間インキュベートする。50 μlの [³⁵S]-GTPγSを終濃度0.25 nMになるよう混合し、さらに30℃で30分間インキュベートする。結合反応はグラスフィルター(Whatman GF/Bグレード)上で氷冷バッファー(50 mM Tris-Cl, 1 mM MgCl₂, pH. 7.4)にて5回洗浄することにより終了する。液体シンチレーションカウンターにてフィルター上の放射能をカウントし、50 μMの放射能標識されていないGTPγSをサンプルとしたときの値をバックグラウンドとして特異的結合値を算出する。

40

候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない結合値に比して被験物質を添加した結合値が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50% 以上低下している被験物質

50

を、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する候補化合物として選択する。

【0308】

実施例11 REG IIIの機能（活性）抑制剤のスクリーニング

Malika, Dら、Gastroenterology, 114, 808-816, 1998およびMalika, Dら、Gastroenterology, 119, 816-828, 2000の方法を参考にREG IIIのアポトーシス抑制活性を測定することができ、この測定系を用いてREG IIIの機能（活性）を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

AR4-2J細胞（ラット膵臓腺房細胞）を調製し、PAP（REG III）遺伝子を導入する。 7×10^5 細胞を6ウェルマイクロプレートに播種し、24時間培養する。10
無血清培地に交換し、被験物質添加後、さらに過酸化水素を0.15 mMになるように添加し、1時間反応させる。10%血清を含む培地に交換し、さらに16時間培養する。最終濃度が317 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS)を添加し、2時間さらに培養した後、490 nmの吸光度（リファレンス波長は630 nm）にて生存細胞を測定する。ベクターのみを導入したAR4-2Jを0%アポトーシス抑制活性、REG 3遺伝子を導入し、被験物質を添加しなかったAR4-2Jを100%アポトーシス抑制活性を示すコントロールとして用い、候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない細胞系に比して被験物質を添加した細胞系のアポトーシス抑制活性が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する候補化合物として選択する。20

【0309】

またIovanna, J.ら、J Biol Chem, 266, 24664-24669, 1991の方法を参考に、REG IIIの細菌凝集活性を測定することができ、この測定系を用いてREG IIIの機能（活性）を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

大腸菌JM109株を定常状態に達するまで振盪培養する（L-broth、37℃）。菌体を回収、洗浄後、マイクロプレート1ウェルあたり 5×10^7 細胞を200 μl の0.5 mM CaCl_2 を含むPBS溶液に懸濁して添加する。被験物質添加後、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のPAP（REG III）を添加し、25℃にて3時間反応させた後、凝集の程度を600 nmの吸光度にて測定する。ネガティブコントロールとして、アルブミン（50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、ポジティブコントロールとしてコンカナバリンA（50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を用いる。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない凝集に比して被験物質を添加した凝集が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する候補化合物として選択する。30

【0310】

実施例12 LPAPの機能（活性）抑制剤のスクリーニング

Schraven, B.,ら、J. Biol. Chem., 269, 29102-29111, 1994に記載の方法を参考にCD45との結合活性を測定することができ、この測定系を用いてLPAPの機能（活性）を抑制する物質をスクリーニングすることができる。40

Jurkat T-lymphocytes細胞株（ヒト白血病Tリンパ腫由来、ATTC株番号TIB-152、大日本製薬株式会社） 1.0×10^9 細胞を、氷冷TBS（Tris-buffered saline）にて2回洗浄し、溶解バッファ（20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 10 mM NaF, 1 mM sodium ortho vanadate, 1% Brij 58 50

30 ml にて溶解する。これをCD45 モノクローナル抗体を結合させたCNBr-Sepharoseビーズ 3 mlと混合し、細胞溶解液中のLPAP、CD45複合体をビーズに結合させる。さらに溶解バッファーにて3回洗浄した後、3 mlの溶解バッファーを加えて懸濁し、200 µlをマイクロプレートに分注する。50 µlの被験物質を含む、もしくは含まない溶解バッファーを加えて20分間室温にて反応後、遊離する蛋白質を(好ましくは遊離するLPAPを抗LPAP抗体を用いて)測定する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない反応系に比して被験物質を添加した反応系の遊離蛋白質が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上増加した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

10

【0311】

実施例13 Mip-1βの機能(活性)抑制剤のスクリーニング

Laurence, J. S.ら、Biochemistry, 39, 3401-3409, 2000に記載の方法を参考にCCR5との結合活性を測定することができ、この測定系を用いてMip-1βの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

[¹²⁵I] Mip-1β (2200 Ci/mmol, NEN Life Science Products) 0.08 nMと、CCR5遺伝子を導入したCHO (Chinese hamster ovary) 細胞40,000 cellsを、0.1 mlのBinding 緩衝液(50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.5% BSA)中にて27℃、被験物質存在下および非存在下で90分間インキュベートする。結合した[¹²⁵I] Mip-1βを1% BSAで予浸したGF/Cフィルター(Whatman)でろ過することによって選別する。β-シンチレーションカウンターにてフィルターの放射活性を測定する。被験物質無添加群に比して結合したMip-1βが10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

20

【0312】

またLaurence, J. S.ら、Biochemistry, 39, 3401-3409, 2000およびStables, J.ら、Anal. Biochem., 252, 115-126, 1997に記載の方法を参考にCCR5のカルシウム放出活性(GPCRの反応)を測定することができ、この測定系を用いてMip-1βの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

30

CCR5遺伝子を導入したCHO細胞に、apoaequorin遺伝子、G_{α16} (G-蛋白質αサブユニットの一種)遺伝子をコードするプラスミドをさらに導入し、DME M培地に5×10⁶ cells/mlで懸濁する。5 µMのcoelenterazine H (Molecular probes)存在下、暗所で2時間インキュベートする。細胞を7.5倍希釈し、50 µlの懸濁液(3,3000 cells)に、被験物質をDME M培地に溶かした溶液 50 µlを加える。さらに1分後に1 nMのMip-1β (R&D Systems)を添加し、aequorinの蛍光(469 nm)を1分間測定する。候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない細胞に比して被験物質を添加した細胞のカルシウムの放出が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

40

【0313】

実施例14 L-セレクチンの機能(活性)抑制剤のスクリーニング

特開平11-236394に記載の方法を参考にSLeXとの結合活性を測定することができ、この測定系を用いてL-セレクチンの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

まずL-セレクチン/Igキメラタンパクの構築を行う。

50

L-セレクトインと免疫グロブリン (Ig) タンパクからなるキメラタンパクを以下のように構築する。セレクトイン分子としては、ヒトL-セレクトイン (Laski et al., Cell, 56, 1045-1055 (1989)) のDNA配列をもとに、それぞれのN末端から糖との結合に必要とされるレクチンドメイン、EGFドメイン、第1、第2CR (Complement Regulatory) ドメインまでを用いる。一方ヒトIgタンパクとしては、ヒトIgG2 (Elison and Hood, Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 1984-1988 (1982)) のDNA配列をもとに、Hinge領域からCH2、CH3領域までを用いる。それぞれのセレクトインとIgの領域を含むDNA断片は、Polymerase Chain Reaction法 (Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, W. H. Freeman, New York, 1990) を用いてそれぞれ増幅し、その後結合することにより、目的とするLセレクトイン/IgキメラおよびPセレクトイン/Igキメラのタンパクをコードするキメラ遺伝子を作成する。それぞれのキメラ遺伝子は哺乳動物細胞の発現ベクターであるpCDNA-1 (Invitrogen製) に組み込む。これらのプラスミドをpCV2-neo (Clontech社製) とともにヒト腎由来細胞株293細胞にリン酸カルシウム法によりコトランスフェクションし、ネオマイシンによる選択後、目的とするキメラタンパクを発現、分泌する細胞を選別し、細胞株として樹立する。これら樹立細胞を大量培養しその培養上清を回収後、プロテインAカラム (ファルマシア社製) を用いてセレクトインキメラタンパクを精製する。こうして得られたLセレクトイン/Igキメラのタンパクを阻害活性試験に供する。

次いで結合阻害活性試験を行う。

【0314】

ナフトアミドSLeXポリマー 1 mg/mlの水溶液を調製し、ストック液として、-20℃で凍結して保存する。これを使用時に融解し、50%のメタノール水溶液で1.5 μg/mlに希釈する。希釈した溶液をプレートに50 μl/wellで分注し、室温放置により風乾する。8連マルチチャンネルピペットを用いてDPBS 200 μl/wellで3回洗浄した後、5% BSA/DPBSを200 μl/wellに加え室温で2時間放置してブロッキングを行う。その後、DPBS 200 μl/wellで3回洗浄する。以降の洗浄操作においても全て8連マルチチャンネルピペットを使用する。ブロッキングを行っている間にキメラコンプレックスを用意する。希釈は全て1% BSA/DPBSで行う。L-セレクトイン/Igキメラを二次抗体と合わせ室温で30分間放置して、コンプレックスを形成させる。被験化合物またはグリチルリチンを加える時には、DPBSで5倍濃度に調製した阻害剤50 μlにコンプレックス200 μlを加え、更に30分間室温放置する。コントロール群はコンプレックス液にその1/4量のDPBSを添加して調製する。キメラコンプレックスをプレートに各ウェル50 μlに加え、室温で1時間放置する。200 μl/wellのDPBSで7回プレートの洗浄を行う。室温に戻した基質を100 μl/wellに加え、20-30分放置し適当な発色が得られたら1Nリン酸50 μl/wellで反応を止める。各ウェルの450 nmにおける吸光度を測定し、コントロール群における値を100%とし、被験化合物またはグリチルリチンを含むウェルにおける接着量を%コントロールで算出する。

【0315】

なお、用いる実験材料は以下のとおりである。

プレート [ヌンク社製 マキシソープ ルーズ ヌンク-イムノ モジュールプレート] ;

ナフトアミドSLeXポリマー (Miyauchiら, Bioorg. Med. Chem. Lett., 7, 985 (1997) に記載の方法で合成する) ;
グリチルリチン (和光純薬) ;

二次抗体 [カルタグ社製 ヤギ F(ab') 抗ヒト IgG抗体 (Fc, Sp)] ;

基質 [ギブコ社製 TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) 溶液] ;

反応停止液 [1N H₃PO₄] ;

DPBS (ダルベッコ フォスフェート バッファード セライン) (ギブコ社製) ;

BSA (仔ウシ血清アルブミン)。

候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない反応系に比して被験物質を添加した反応系の接着量が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50% 以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

【0316】

10

実施例15 EGFL6の機能(活性)抑制剤のスクリーニング

特開平7-196527に記載の方法を参考にEGFL6の細胞増殖活性を測定することができ、この測定系を用いてEGFL6の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

マウス線維芽細胞Swiss3T3またはラット小腸上皮細胞IEC18(共にAmerican Type Culture Collectionから購入)を96穴カルチャープレートに1穴当たり5000個ずつ蒔き、10%牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培養液(日水製薬社製。以下FBS-DMEMと略記する)で細胞がコンフルエント(細胞密度が増し細胞どうしが接触することで増殖がほぼ停止することを意味する)になるまで培養する(培養液は、1穴当たり0.1ml使用する)。培養液を0.2%FBS-DMEMと交換し、さらに1日培養し、細胞を静止期に導入する。被験物質存在下および非存在下、0.2%FBS-DMEM(50 μ l)にて0.5時間培養する。さらに20ng/mlのEGFL6を含む0.2%FBS-DMEMを50 μ l添加し、17時間培養する。次に、培養液を³H-チミジン(ICNバイオメディカル社製。1 μ Ci/ml)を含む0.2%FBS-DMEM(0.1ml)と交換し、さらに2時間培養する。培養液を除き、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を1穴当たり0.1ml加え細胞を溶解する。セルハーベスター(Skatron INC社製)によりDNAをフィルター(Skatron INC社製)上に回収し、DNAに取り込まれた³H-チミジン量を液体シンチレーションカウンター(LKB社製)で測定する。

20

候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない細胞に比して被験物質を添加した細胞の増殖が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50% 以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

30

【0317】

実施例16 IDOの機能(活性)抑制剤のスクリーニング

Carlin, J. M. ら、J. Interferon Res. 9 329-337 1989に記載の方法を参考にIDOのトリプトファン分解活性を測定することができ、この測定系を用いてIDOの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

24穴プレート1ウェルあたり約 2×10^5 細胞の単球細胞をPeripheral blood mononuclear cell より調製し、10-14日培養してマクロファージとして成熟させる。さらに最終濃度 20 ng / ml のIFN- γ に48時間暴露し、IDOを誘導しておく。培地を抜いた後、25 μ M トリプトファン、1 μ Ci / ml (比活性 20 Ci / mmol) [5-³H]トリプトファンを含むHBSS(Hank's balanced salt solution) 0.4 mlを、被験物質存在下および非存在下にて添加する。4時間インキュベートした後の培養上清(-20℃にて保存可能)について、トリプトファンの分解の程度を調べる。上清よりC₁₈カラムを用いた逆相HPLCにてL-トリプトファン、分解物であるN-フォルミルキヌレニンもしくはキヌレニンを分画し、各画分の放射活性をシンチレーションカウンターにて計測する。自然分解量を細胞非存在下の培養上清より同様に測定して差し引き、細胞によるトリプトファンの分解量をIDO活性として算出する。

40

50

候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない細胞に比して被験物質を添加した細胞のIDO活性が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する候補化合物として選択する。

【0318】

実施例17 IL-8の機能（活性）抑制剤のスクリーニング

[¹²⁵I] IL-8を用いた結合試験により、被験物質の受容体に対する親和性を測定することができる。THP-1細胞を10% FCS又はFBSを含むRPMI-1640培地にて継代し、その対数増殖期細胞 5×10^6 cell / 400 μ l を0.1%ウシ血清アルブミンを含むRPMI-1640培地に懸濁する。この懸濁液に [¹²⁵I] IL-8（最終濃度 0.06 mM 比活性 2200 Ci / mmol）と、被験物質のPBSあるいはDMSO溶液 4 μ l（最終濃度 100 μ M）とを混合する。水中2時間反応させ遠心後、1 mlのPBSで5回洗浄する。最終的にPBS 1 mlに懸濁し、細胞の総放射活性を測定する。THP-1細胞に対する [¹²⁵I] IL-8の非特異的結合量（THP-1細胞のIL-8受容体以外に結合した [¹²⁵I] IL-8）は上記操作の被験物質の代わりに 1 mg / ml IL-8 2 μ l をTHP-1細胞懸濁液に加え求める。THP-1細胞に対する [¹²⁵I] IL-8の特異的結合量は、全結合量（被験物質非存在下での [¹²⁵I] IL-8の結合量）から非特異的結合量を差し引いて求める。すなわち、次式にて被験物質の 100 μ M 用量でのTHP-1細胞とIL-8の特異的結合に対する阻害率（%）を求める。

阻害率（%） = $\left[\frac{(\text{全結合量} - \text{非特異的結合量}) - (\text{被験物質添加時結合量} - \text{非特異的結合量})}{(\text{全結合量} - \text{非特異的結合量})} \right] \times 100$

候補物質のスクリーニングは、阻害率が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上を示した被験物質を、IBDを緩和、抑制（改善、治療）する候補化合物として選択する。

【0319】

実施例18 CD11cの機能（活性）抑制剤のスクリーニング

Stacker, S. A. ら、J. Immunol., 146, 648-655 (1991)の方法を参考にCD11cの内皮細胞接着活性を測定することができ、この測定系を用いてCD11cの機能（活性）を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

すなわち、

1. プレートにCD11cをコートしたのち、洗浄する、
 2. 被験物質存在下および非存在下にて内皮細胞懸濁液を添加し、反応させる、
 3. 非接着細胞を除去後、細胞接着の度合いを調べる、
- を行う。

【0320】

HUVEC（内皮細胞・human umbilical vein endothelial cells）はフィブロネクチンコートディッシュにて、20% FBS, 5 mM L-glutamine, 50 μ g / ml gentamicin, 100 μ g / ml endothelial cell growth supplement（バイオメディカルテクノロジー社）、100 μ g / ml heparin を含むM199培地にて培養する。使用前に5 U / ml のヒト rIL-1 β （ベーリンガーマンハイム社）もしくは、5 ng / ml LPS（シグマ社）を加え、18-24時間刺激しておく。回収後、アッセイバッファー（PBS / 5% FBS / 2 mM MgCl₂）で2回洗浄し、100 μ CiのNa₂⁵¹CrO₄（New England Nuclear）とともに37℃で1時間インキュベートして標識し、アッセイバッファーにて3回洗浄した懸濁液をアッセイに用いる。一方50 μ g / mlのCD11c / PBS溶液を浮遊細胞用96ウエルのプレート（SUMILON）に、50 μ l / wellで分注して、37℃で2時間反応させ、PBSでウエルを洗浄する。被験物質存在下お

よび非存在下にてHUVEC 5×10^4 細胞を各ウェルに添加し、5 g x 3 min の遠心によって細胞を底面に集め、37℃で20分間インキュベートする。アッセイバッファーにて3回洗浄した後、100 μ l の0.1 M NaOH/0.1% TX-100にて結合した細胞を溶解し、 γ 線量を測定する。 γ 線量と、ウェル当たりの細胞数(スタンダードとして段階希釈した細胞)をグラフにプロットして、スタンダードカーブを一次直線として作成する。このスタンダードカーブを用い、蛍光強度からウェル当たりの細胞数を算出する。得られた細胞数を蒔いた細胞数で割ることで、細胞接着の割合を得る。

候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない細胞に比して被験物質を添加した細胞の接着が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

10

【0321】

実施例19 TLR2の機能(活性)抑制剤のスクリーニング

特開2002-45086に記載の方法を参考にTLR2のマクロファージ活性化作用を測定することができ、この測定系を用いてTLR2の機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

合成グラム陰性菌由来リポペプチドJBT3002の調製に関してはDong, Z. J. ら、Leukoc. Biol., 63, 766-774 (1998)に記載され、また、合成マイコプラズマ由来リポペプチドMALP-2の調製に関してはMuhlradt, P. F. ら、J. Exp. Med., 185, 1951-1958 (1997)に記載されている。マウスの腹腔マクロファージ(5×10^4 cells)を、被験物質存在下および非存在下にて5 μ g/mlのJBT3002又はMALP-2といっしょに24時間培養し刺激する。培養後、培養上清中のTNF- α (TNF α)及びNO $_2^-$ (NO)の産生量を測定する。TNF α の濃度をELISAにより、NO $_2^-$ はNO $_2^-$ /NO $_3^-$ アッセイキット(同仁科学研究所社製)を使用し、Greiss法により測定する。

20

候補物質のスクリーニングは、被験物質を添加しない細胞に比して被験物質を添加した細胞のTNF α もしくはNO $_2^-$ が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上減少した系に添加していた被験物質を、IBDを緩和、抑制(改善、治療)する候補化合物として選択する。

30

【0322】

【発明の効果】

本発明によって、IBD患者(潰瘍性大腸炎及びクローン病)の結腸病変組織において、結腸正常組織と比較して特異的に発現増大している遺伝子(FcyRIIIa遺伝子、FcyRIIIb遺伝子、Mig遺伝子、NRG-2遺伝子、ヘキソキナーゼ3遺伝子、HM74遺伝子、REGIII遺伝子、LPAP遺伝子、Mip-1 β 遺伝子、レーセクチン遺伝子、EGFL6遺伝子、IDO遺伝子、IL-8遺伝子、CD11c遺伝子およびTLR2遺伝子)が明らかになった。かかる遺伝子はIBDの遺伝子診断に用いられるマーカー遺伝子(プローブ、プライマー)として有用である。かかるマーカー遺伝子によればIBDであるかどうかを明らかにすることができ(診断精度が向上)、これによりより適切な治療を施すことが可能となる。すなわち、IBDの適切な治療のためのツールとして利用することができる。

40

【0323】

また、上記遺伝子の発現増加とIBDとの関連性から、該遺伝子の発現を抑制する化合物は、IBDの治療薬として有用と考えられる。従って、これら遺伝子の発現の抑制または減少、または当該遺伝子がコードするタンパク質の発現や機能(活性)の抑制または減少を指標とすることによって、IBDの治療薬となり得る候補薬をスクリーニングし選別することが可能である。本発明は、このようなIBD治療薬の開発技術をも提供する。

【0324】

【配列表】

50

SEQUENCE LISTING

(110) Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

(120) A marker of inflammatory bowel disease and its use

(130) 132990

10

(160) 30

(170) PatentIn Ver. 2.1

(210) 1

(211) 887

20

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 1

tccttggiga ctgtccact ccagtgiggc atcaltgggc agctgtcctt cccaactgct 60
 ctgtacttc tagttcagc tggcatgcgg actgaagatc tcccaaaggc tgtgggttc 120
 ctggagcctc aatggtacag cgtgctigag aaggacagtg tgactctgaa gtgccaggga 180
 gcctactccc ctgaggadaa ttccacacag tggttcaca atgagagcct catctcaagc 240
 caggcctcga gctacttcac tgacgtgcc acagicaacg acagtggaga gtacagggtc 300
 cagacaaacc tctccacctt cagtgacctg gtgcagctag aagtcataat cggctggctg 360
 ttgctccagg cccctcggtg ggtgttcaag gaggaagacc ctattcacct gagggttcac 420
 agctggaaga acactgtctt gcataagggt acatatttac agaatggcaa agacaggaag 480
 tattttcatc ataattctga ctccacatt caaaagcca cactcaaaga tagcggctcc 540
 tacttctgca ggggcttgt tggagtaaa aatgigtctt cagagacigt gaacatcacc 600
 atcactcaag gtttggcagt gtcaaccatc tcatattctt ctccacctgg gtaccaagtc 660

30

40

tctttctgct tggigatggt actccttttt gcagiggaca caggactata tttctctgtg 720
 aagacaaaca ttigaagctc aacaagagac tggaggacc ataaacttaa atggagaaag 780
 gacctcaag acaaatgacc cccatcccat gggagtaata agagcagigg cagcagcatc 840
 tctgaacatt tctctggatt tgcaaccca tcatctcag gcccttc 887

<210> 2

10

<211> 2545

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atccaataca ggagtgactt ggaactccat tctatcacta tgaagaaaag tggigtcttt 60
 ttctcttgg gcatcatctt gctggttctg atiggagtc aaggaacccc agtagtgaga 120
 aagggtcgt gticctgcat cagcaccaac caagggacta tccacctaca atccttgaaa 180
 gaccttaaac aatttgcctc aagcccttcc tgcgagaaaa ttgaaatcat tgctacactg 240
 aagaatggag ttcaaacaig tctaaaccca gattcagcag atgtgaagga actgattaaa 300
 aagtgggaga aacaggctag ccaaaagaaa aagcaaaaga atgggaaaaa acatcaaaaa 360
 aagaaagttc tgaagttcg aaaatctcaa cgttctcgtc aaaagaagac tacataagag 420
 accacttcac caataagtat tctgtgttaa aaatgttcta ttttaattat accgctatca 480
 ttccaaagga ggatggcata taatacaaag gcttattaat ttgactagaa aatttaaaac 540
 attactciga aattgtaact aaagttagaa agttgatttt aagaatccaa acgttaagaa 600
 ttgttaaagg ctatgatgtt ctttgttctt ctaccacca ccagtigaat ttcatcatgc 660
 ttaaggccat gattttagca ataccatgt ctacacagat gttcaccaa ccacatccca 720
 ctacaacag ctgcciggaa gagcagccct aggcctccac gtactgcagc ctccagagag 780
 tatctgaggc acatgtcagc aagtcctaag cctgttagca tgctggtag ccaagcagtt 840
 tgaattgag ctggaccica ccaagctgtt gtggccatca acctctgtat ttgaatcagc 900
 ctacagccct cacacacaat gtgtctgaga gattcatgtt gattgttatt gggatcacc 960
 actggagatc accagtggtt ggcttcaga gcctccttc tggcttggga agccatgtga 1020

20

30

40

ttccatcttg cccgctcagg ctgaccactt tatttctttt tgttcccc ttgttcattc 1080
 aagtcagctc ttctccatcc taccacaatg cagtgccttt cttctctcca gtgcacctgt 1140
 cataatgctt gatttatctg agtcaactcc ttctcatct tgtccccaac accccacaga 1200
 agtgccttct tctcccaatt catctcact cagtccagct tagttcaagt cctgcctctt 1260
 aaataaacct ttttggacac acaaatatc ttaaaactcc tgtttcactt ggttcagtac 1320
 cacatgggtg aacactcaat ggttaactaa ttcttgggtg tttatcctat ctctccaacc 1380
 agattgtcag ctcttgagg gcaagagcca cagtatatt cctgtttct tccacagtgc 1440
 ctaataatc tgtggaacta ggttttaata atttttaat tgatgttgtt atgggcagga 1500
 tggcaaccag accattgct cagagcaggt gctggctctt tcttggctac tccatgttgg 1560
 ctgcctctg gtaacctctt acttattatc ttccaggacac tcaactacag gaccagggat 1620
 gatgcaacat ccttgtctt ttatgacagg atgtttgctc agcttctcca acaataagaa 1680
 gcacgtggta aaacacttgc ggatactctg gactgtttt aaaaaatata cagtttaccg 1740
 aaaatcatat aatcttaca tgaaggagc ttatagatc agccagtac caacctttc 1800
 ccaaccatc aaaaattcct ttcccgaag gaaaagggt ttctcaataa gccctcagct 1860
 tctaagatc aacaagatg ccaccgagat ccttatcga actcaittt ggcaaatatg 1920
 agttttattg tccgtttact tgtttcagag ttgtattgt gattatcaat taccacacca 1980
 tctcccatga agaaaggga cggigaagta ctaagcgta gaggaagcag ccaagtcggt 2040
 tagtggaaagc atgattgggtg cccagttagc ctctgcagga tgggaaacc tcttccagg 2100
 ggaggttcag tgaatttgtt aggagaggtt gctgtggcc agaattttaa cctatactca 2160
 ctctccaaa ttgaactact gctcacactg ctgatgatt agagtgcgt cgggtggaga 2220
 tcccaccga acgtcttctc taatcatgaa acctcctagt tcttcatgt aacttccctg 2280
 aaaaatctaa gtgtttcata aatttgagag tctgtgacc acttacctg catctcacag 2340
 gtagacagta tataactaac aaccaagac tacatattgt cactgacaca cagttataa 2400
 tcatttaica tatatataca tacatgata cactctcaa gcaataatt tttcacttca 2460
 aaacagtatt gacttgtata ccttgtaatt tgaatatatt tcttgttaa aatagaatgg 2520
 tatcaataaa tagaccatta atcag 2545

10

20

30

40

(211) 3020

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 3

cctccaggtc ctggcgacac gggtaggagc gctgcgctgc gccgcgctgc gcatcgccgc 60
 ccgcttgccg cctgccccct gccctagctg ggcaccctcc ccggctgcc ggtggagggc 120
 taagaggcgc taacgttacg ctgtttccgg ttctccagcg ggctctgttt cccctcccaa 180
 ggcggcgccg gctgagcggc ggagcccccc aaatggcctg gccagatgcg gcaggtttgc 240
 tgcctagcgc tgcgcgccgc gccactggag aagggtcggg gcagcagcta cagcgacagc 300
 agcagcagca gcagcgagag gaggcagcagc agcagcagca gcagcagcga gagcggcagc 360
 agcagcagga gcagcagcaa caacagcagc atctctcgtc ccgttcgcc cccagagccg 420
 cggccgcagc aacagccgca gcccgcagc ccgcagccc ggagagccgc cggccgttcg 480
 cgagccgcag ccgccggcgg catgaggcgc gaccggccc cggctttctc catgtctctc 540
 ttcgggtgtg cgttcgctg ctactcggcc agcccaagt cagtcagga ccaggcgtac 600
 aaggcaccgc tgggtgtgga gggcaaggta caggggctgg tccagccgg cggctccagc 660
 tccaacagca cccgagagcc gccgcctcgc ggtagggtag cgttggttaa ggtgctggac 720
 aagtggccgc tccggagcgg ggggtctgag cgcgagcagg tgatcagctt gggctcctgt 780
 gtgccgctcg aaaggaacca gcgtacatc ttttcttgg agcccacgga acagccctta 840
 gtctttaaga cggccttgc cccctcgat accaacggca aaaatctcaa gaaagaggig 900
 ggcaagaicc tgtgcactga ctgcgccacc cggcccaagt tgaagaagat gaagagccag 960
 acgggacagg tgggtgagaa gcaatcgtg aagtgtgagg cagcagccgg taatccccag 1020
 ccttcttacc gttggttcaa ggatggcaag gagctcaacc gcagccgaga caticgcatc 1080
 aaatatggca acggcagaaa gaactcacga ctacagtcca acaaggtaga ggtggaggac 1140
 gctggggagt atgtctgcga ggcggagAAC atcttgggga aggacaccgt ccggggccgg 1200
 ctttacgta acagcgtgag caccacctg tcactctgtt cggggcacgc ccggaagtgc 1260
 aacgagacag ccaagtccta ttgcgtcaat ggaggcgtct gctactacat cgagggcatac 1320
 aaccagctct cctgcaaatg tccaaatgga ttcttcggac agagatgitt ggagaaactg 1380
 cctttgcgat tgtacatgcc agatccaaag caaaaagccg aggagctgta ccagaagagg 1440

10

20

30

40

gtccigacca tcacgggcat ctgcgtggct ctgcgtgtcg tgggcatcgt ctgigtggtg 1500
 gcctactgca agaccaaaaa acagcgggaag cagaigcaca accacctccg gcagaacatg 1560
 tggccggccc atcagaaccg gagcttggcc aatggggcca gccacccccg gctggacca 1620
 gaggagatcc agatggcaga ttatatitcc aagaacgtgc cagccacaga ccatgtcatc 1680
 aggagagaaa ctgagaccac ctctcttggg agccactctt gtctctcttc tcaccactgc 1740
 tccacagcca caccaccttc cagccacaga cagcagagcc acacgtggag cctggaaagt 1800
 tctgagagcc tgacttctga ctcccagtcg gggatcatgc tatcatcagt gggtaaccagc 1860
 aaatgcaaca gccagcatg tgtggaggcc cgggcaaggc gggcagcagc ctacaacctg 1920
 gaggagcggc gcaggggcac cgcgccacc taltacgatt ccgtggactc ccttcgcgac 1980
 tccccacaca gcgagaggta cgtgtcggcc ctgaccacgc ccgcgcgcct ctgcgccgtg 2040
 gacttccact actcgcctggc cagcaggtg ccaactttcg agatcacgtc cccaactcgc 2100
 gcgcacgccg tctcgtctgc gccggcggcg cccatcagtt accgcctggc cgagcagcag 2160
 ccgttacitc ggcacccggc gccccccggc ccgggacccg gacccgggcc cgggccccgg 2220
 cccggcgcag acatgcagcg cagctatgac agctactatt accccgcggc ggggccccga 2280
 ccgcggcgcg ggacctgcgc gctcggcggc agccitggca gccitgccgc cagccccctc 2340
 cgcacccccg aggcagacga gtacgagacc acgcaggagt gcgcgcccc gccgcgcgcg 2400
 cggccgcgcg cgcgcgtgtc gtccgcagg acgtcggcgg gggcccgcg cttggcgcgc 2460
 tgcgcctca acgggcttgc ggcgcagcgc gcacgggccc cgagggaactc gctgtcgtc 2520
 agcagcggct cggcggcggc ctacgcctcg gcgtcggacg acgacgcgga cgacgcggac 2580
 ggggcgcctg cggccgagag cacaccttcc ctgggcctgc gtggggcgca cgacgcgtc 2640
 cgctcggact gcgccact gtgcccggcg gccgacagca ggacttacta ctacttggac 2700
 agccacagca cgcgggccag cagcagacac agccgcgggc cggccccgcg ggccaagcag 2760
 gactcggcgc cactctaggc ccccgccgcg gcggcctccg ccccgccgc cccactatct 2820
 ttaaggagac cagagaccgc ctactggaga gaaaggagga aaaaagaaat aaaaatattt 2880
 ttattttcta taaaaggaaa aaagtataac aaaatgttt attttcattt tagcaaaaat 2940
 tgccttataa tactagctaa cggcaaaggc gtttttatag ggaaactatt tatatgtaac 3000
 atcctgattt acagcttcgg 3020

10

20

30

40

(210) 4

(211) 3062

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 4

gacaagagct cagaccigag gagagigact agcttctctg igtcccaggt ggccacctic 60
 cactgtggaa gctcatggac tccattgggt cticagggtt gcggcagggg gaagaaaccc 120
 tgagtigctc tgaggagggc tigcccgggc cctcagacag cticagagctg gtcgaggagt 180
 gcctgcagca gtccaaggtg acaagggcac agctacagca gatccaagcc agcctcttgg 240
 gtcccatgga gcaggcgctg aaggacagg ccagccctgc cctgcggtc cggatgctgc 300
 ctacatacgt ggggtccacc ccacatggca ctgagcaagg agacttcgtg gtgctggagc 360
 tggggccac aagggcctca ctgcgtgtt ttgggtgac tctaactggc attgaggggc 420
 atagggtgga gccagaagc caggagttag tgatcccca agaggtagt ctgggtgctg 480
 gccagcagct cttagacttt gctgccact gccgtctga gtctctggat gcgcagccig 540
 tgaacaaca gggctgcag cttagcttca gcttctctt ccttgtcac cagacgggt 600
 tggacaggag caccctcatt tctggacca aaggtttag gtgcagtggt gtggaaggcc 660
 aggatgtggt ccagctgctg agagatgcca ttccgagga ggggacctac aacatcgacg 720
 tggttgctgt ggigaacgac acagtgggca ccatgatggg ctgtgagccg ggggtcaggc 780
 cgtgtgaggt tgggctagtt gtagacagg gcaccaacgc gtgttacatg gaggaggcac 840
 ggcatgtggc agtgctggac gaagaccggg gccgcgtcgt cgtcagcgtc gagtggggct 900
 ccttaagcga tgatggggcg ctgggaccag tgcagaccac cttcgacat accctggacc 960
 atgagtcctt gaatcctggt gctcagaggt ttgagaagat gatcggaggc ctgtacctgg 1020
 gtgagctggt gcggctgggt ctggctcact tggccgggtg tgggtctc tttggtggct 1080
 gcacctcccc tggctgctg agccaaggca gcatcctctt ggaacacgtg gctgagatgg 1140
 aggacccctc tactggggca gcccggtgcc atgctatctt gcaggacttg ggctgagcc 1200
 ctgggcttc ggaatgtgag cttgtgcagc acgtctgtgc ggccgtgtgc acgcgggctg 1260
 cccagctctg tgcctccgcc ctggcgctg ttctctctg cctccagcac agccgggagc 1320
 aacaaacact ccagggtgct gtggccaccg gaggccgagt gigtgagcgg caccacaggt 1380

tctgcagcgt cctgcagggg acagtgatgc tcttggcccc ggaatgcgat gtciccttaa 1440
 tccccctcgt ggaatgggtt ggcgggggag tggcgatgtt gactgccttg gctgcccgtc 1500
 tggctgcccc ccggcgcttg ctggaggaga ccttggcccc attccggttg aacctgatc 1560
 aactggcctg ggttcaggca cagatgcgga aggccatggc caaggggctc cgaggggagg 1620
 cctccicctt tcgcatgctg cccactttcg tccggggccac ccttgacggc agcgagcgag 1680
 gggatttctt ggccctggac ctgggggca cgaacttcg igtctcctg gtacgtgtga 1740
 ccacaggcgt gcagatcacc agcgagatct acitccattc cgagactgtg gcccagggtt 1800
 ctgggcagca gctctttgac cacatcgttg acgtcatcgt ggacttcag cagaagcagg 1860
 gcctgagcgg gcagagcctc ccactgggtt ttaccttctc ctcccaagt aggcagcttg 1920
 gcctagacca gggcatctc ctgaactgga ccaagggtt caaggcatca gactgcgagg 1980
 gccaagaigt cgtgagctg ttgcgggaag ccatcactcg cagacaggca gttgagctga 2040
 atgtgggtgc catgtcaat gacacggtag ggacctgat gtctgttggc tatgaggacc 2100
 ccgttgcca gataggcctc attgtcgaa ccggcaccaa tgcctgtac atggaggagc 2160
 tccggaagt ggccggcgtg cctggggact caggccgat gtgcatcaac atggagtggg 2220
 gcgcttttgg gacgatggc tctctggcca tgcctagcac ccgtttgat gcaagtgttg 2280
 accaggcgtc catcaacccc ggcaagcaga ggtttgaaaa gatgatcagc ggcatgtacc 2340
 tggggagat cgtccgccac atctttttac atttaaccag ccttggcgtt ctcttcggg 2400
 gccagcagat ccagcgctt cagaccaggg acatettcaa gaccaagttc ctctctgaga 2460
 tcgaaagiga cagccitggc ctgcggcagg tccgagccat cctagaggat ctggggctac 2520
 cctgacctc agatgacgcc ctgatgttgc tagagggttg ccaggctgtg tcccagaggg 2580
 ctgcccagct ctgtggggcg ggtgtagctg ccgtgttga gaagatccgg ggaaccggg 2640
 gcctgggaaga gctggcagt tctgtggggg tggatggaac gctctacaag ctgcacccgc 2700
 gcttctccag cctgggtggc gccacagtgc gggagctggc ccttcgctgt gtggctacgt 2760
 tctgcagtc agaggatggg tccggcaag gtgcggccct ggtcacctgt gttgcctgcc 2820
 gccitgcga gttgactgt gtcigaggaa acctccaggc igaggaggtc tccgccgcag 2880
 ccttgctgga gccgggtcgg ggtctgcctg ttccagcc agggccagcc acccaggact 2940
 ctgggacat ccatgtgtg accctctgc ggccatttgg ccttgctccc tggctttccc 3000
 tgagagaagt agcactcagg ttagcaatat atatataa ttattttaca aaaaaaaaaa 3060
 aa 3062

10

20

30

40

(210) 5

(211) 2051

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 5

cgccacitig ciggagcatt cactaggcga ggcgctccat cggactcact agccgcacitc 60
algaatcggc accatctgca ggatcacitit ciggaaatag acaagaagaa ctgctgtgtg 120
ttccgagatg acttcattgc caagggtgtg cggccgggtg tggggctgga gtttatctit 180
gggtttctgg gcaatggcct tgcctgttgg attttctgtt tccacctcaa gtccctggaaa 240
tccagccgga ttttctgtt caacctggca gtatctgact ttttactgat catctgccig 300
cggttctgta tggactacta tgtgcggcgt tcagactgga actttgggga catcccttgc 360
cggctggigc tcttcatgtt tgccatgaac cggcagggca gcatcatctt cctcacggig 420
gtggcggtag acaggatatt cgggtgggtc catccccacc acgcccigaa caagatctcc 480
aatggacag cagccatcat ctcttgctt ctgtgggca tcatgttgg cctaacagtc 540
cacctcciga agaagaagt gctgatccag aatggccctg caaatgtgtg catcagcttc 600
agcatctgcc atacctccg gtggcaggaa gctatgttcc tcttggagt cctctgccc 660
ctgggcaica tctgttctg ctacgccaga attatctgga gcttgcggca gagacaaatg 720
gaccggcatg ccaagatcaa gagagccatc acctcatca tgggtggggc catcgtctit 780
gtcatctgt tcttcccag cgtgggtgtg cggatccgca tcttctggct cctgcacact 840
tcgggcacgc agaattgta agtgtaccgc tgggtggacc tggcgttctt taccacttc 900
agcttcacct acatgaacag catgtggac cccgigggtg actacttctc cagcccatcc 960
tttccaact ttttccac ttgatcaac cgtgccctcc agaggaagat gacaggtag 1020
ccagataata accgcagcac gaggtctgag ctacagggg accccaacaa aaccagaggc 1080
gtccagagg cgttaatggc caactccgtt gagccatgga gccccctta tctgggcccc 1140
acctcaata accattccaa gaaggacat tgtaccaag aaccagcatc tctggagaaa 1200
cagttgggt gttgcatga gtaatgtac tggactcggc ctaagggttc ctggaacttc 1260

10

20

30

40

cagattcaga gaatctgatt tagggaaact gtggcagatg agtgggagac tgggtgcaag 1320
 gtgtgaccac aggaatcctg gaggaacaga gaggtaaagct tctaggcatc tgaacttgc 1380
 ttcatctctg acgctcgcag gactgaagat gggcaaattg taggcgttcc tgcigagcag 1440
 agttggagcc agagatctac ttgtgacttg ttggccttct tcccacatct gccicagact 1500
 gggggggct cagctcctcg ggtgatatct agccigcttg tgagctctag cagggataag 1560
 gagagctgag attgaggga attgtgttgc tctggagga agcccaggca tcattaaaca 1620
 agccagtagg tcacctggct tccgtggacc aattcatctt tcagacaagc ttagagaaa 1680
 tggactcagg gaagagactc acatgctttg gttagtatct gtgtttccgg tgggtgtaat 1740
 aggggattag cccagaagg gactgagcta aacagtgtta ttaaggaaa ggaaatggca 1800
 ttgtctctt caaccagca ctaatgcaat ccattcctct ctgtttata gtaatctaag 1860
 ggttgagcag ttaaaacggc ttcaggatag aaagctgttt ccacctgtt tcgttttacc 1920
 attaaaagg aaacgtgcct ctgccccacg ggtagaggg gtgcacgttc ctctgggtc 1980
 ctctgcttgt gtttctgtac ttacaaaaa tctaccactt caataaatt tgataggaga 2040
 caaaaaaaaa a 2051

10

20

(210) 6
 (211) 807
 (212) DNA
 (213) Homo sapiens

30

(400) 6
 aaaccatacc atatcccacc agagagtgac tctgattgc ctctcaagt cgcagacact 60
 atgtgcctc ccatggcctt gccagtgta tcttggatgc tgccttccg cctcatgtc 120
 ctgtctcagg ttcaaggiga agaaccacag agggaaactgc cctctgcacg gatccgtgt 180
 cccaaaggct ccaaggccta tggctccac tgcctatgctt tgtttttgt accaaaatcc 240
 tggacagatg cagatctggc ctgccagaag cggccctctg gaaacctggt gtcgtgtc 300
 agtgggctg agggatcctt cgtgtctcc ctggigaaga gcattggtaa cagctactca 360
 tacgtctgga ttgggtcca tgacccaca caggccacc agcccaatgg agaagggtg 420

40

gagtggagta gcagtgatgt gatgaattac ttigcatggg agagaaatcc ciccaccatc 480
 tcaagccccc gccactgtgc gagcctgtcg agaagcacag catttctgag gttgaaagat 540
 tataactgtat atgtgagggt accctatgtc tgaagtcca ctagctagtg caggaggaa 600
 gtcagcagcc tgggtttggg gtcgaactca tcatgggcat gagaccagtg tgaggactca 660
 cccctggaaga gaattatcgc ttaattcccc caaccigacc accctattct tatctttctt 720
 ctgtttcttc ctccccgtcg tcatttcagt ctcttcattt tgcatacgg cctaaggctt 780
 taaagagcaa taaaattttt agtcctgc 807

10

(210) 7

(211) 916

(212) DNA

(213) Homo sapiens

20

(400) 7

atttctcgt cgacacagcc agagctggag ggggtgccc ggcacggagg ggcctgcgga 60
 ccaatggctc tgcctgtcac cttagggctc gggatgtctc tggccctgcc aggggccttg 120
 ggctcgggtg gcagcgcgga ggacagcgtg ggctccagct ctgtcacgtg tgtctgtctg 180
 ctgtgtctgc tctactgtct ggccactggc ctgacactgg cctggcgccg cctcagccgt 240
 gactcagggg gctactacca cccggcccg ctaggtgccg cgctgtgggg ccgcacgcgg 300
 cgctgtctct gggccagccc cccaggtcgc tggctgcagg cccgagciga gctggggctc 360
 acagacaatg accttgagcg acaggaggat gagcaggaca cagactatga ccacgtcgcg 420
 gatggctggc tgcaggctga ccttgggaa ggcgagcagc aatgtggaga ggcgtccagc 480
 ccagagcagg tccccgtcg ggctgaggaa gccagagaca gtgacacgga gggcgacctg 540
 gtctcggct ccccaggacc agcgagcgca ggggcagtg ctgaggccct gctgagtgac 600
 ctgcagcct ttgttggcag cgcagcctgg gatgacagcg ccagggcagc tggggccag 660
 ggctccatg tcaccgact gtagaggccg gtcttgggtg ccatccctg tcacagccgc 720
 tctctccccg tgcctctgtc tccaagatg ccatggctgg actggacccc cagcccacat 780
 gacctgcct cagactgtca cccctaccag ttcccaagtc catgtgtacc ccgtcacca 840

30

40

cgggaacggc ccccccaac cacaggcatc aggcaacat ttgaaataaa actccttcag 900
cctgtgaaaa aaaaaa 916

<210> 8

<211> 696

<212> DNA

10

<213> Homo sapiens

<400> 8

ttccccccc ccccccccc ccccgccga gcacaggaca cagctgggtt ctgaagcttc 60
tgagtctgc agcctcacct ctgagaaac ctctttcca ccaataccat gaagctctgc 120
gtgactgicc tgtctctct catgctagta gctgccttct gctctccagc gctctcagca 180
ccaatgggt cagacctcc caccgctgc tgcctttctt acaccgcgag gaagcttctt 240
cgcaacttgc tggtagatta ctatgagacc agcagcctct gctcccagcc agctgtggtt 300
ttccaacca aaagaagcaa gcaagtcgt gctgatccca gtgaatcctg ggtccaggag 360
tacgtgatg acctgggaact gaactgagct gctcagagac aggaagcttt cagggaaggt 420
caccgagcc cggatgcttc tccatgagac acatctctc catactcagg actcctctcc 480
gcagtccctg tccctctct taatttaac tttttatgt gccgtgttat tgtattaggt 540
gtcatttcca ttatttata tagtttagcc aaaggataag tgcctatgg ggaiggtcca 600
ctgtcacigt ttctctgctg ttgcaaatac atggataaca catttgattc tgtgtgtttt 660
ccataataaa actttaaat aaaatgcaga cagtta 696

20

30

<210> 9

<211> 2324

<212> DNA

40

<213> Homo sapiens

(400) 9

ctcccttigg gcaaggacct gagacccttg tgctaaagta agaggctcaa tgggctgcag 60
 aagaactaga gaaggaccaa gcaaagccat gatatttcca tggaaatgtc agagcaccca 120
 gagggacita tggaaacatct tcaagtigtg ggggiggaca atgtcttgtt gtgatttcc 180
 ggcacatcat ggaaccgact gciggacita ccattattct gaaaaaccca tgaactggca 240
 aagggtctaga agattctgcc gagacaatta cacagattta gtigccatac aaaacaaggc 300
 ggaaattgag tatctggaga agactctgcc tticagtcgt tcttactact ggataggat 360
 ccggaagata ggaggaatat ggacgtgggt gggaaccaac aaatctctta ctgaagaagc 420
 agagaacigg ggagatggtg agcccaacaa caagaagaac aaggaggact gcgtggagat 480
 ctatatcaag agaacaacag atgcaggcaa atggaacgat gacgcctgcc acaaactaaa 540
 ggcagccctc tgttacacag ctcttggcca gccctgggtc tgcagtgccc atggagaalg 600
 ttagaaaac atcaataatt acaccigcaa ctgigtatgt gggctactatg ggccccagtg 660
 tcagtttgtg attcagtggt agccttggga ggccccagag ctgggiacca tggactgtac 720
 tcacccttgg ggaacttca gcttcagctc acagigtgcc ttcagctgct ctgaaggaa 780
 aaacttaact ggatitgaag aaaccacctg tggaccattt ggaaactggg catctccaga 840
 accaaccigt caagtattc agtgtgagcc tctatcagca ccagatttgg ggatcatgaa 900
 ctgtagccat cccctggcca gcttcagctt tacccttgca tgtacctta tctgctcaga 960
 aggaactgag ttaattggga agaagaaaac cattigtgaa tcatctggaa tctgggtcaa 1020
 tctagtcca atatgtcaa aattggacaa aagtitttca atgattaagg aggttgatta 1080
 taacccctc ttcattccag tggcagtcgt ggttactgca ttctctgggt tggcatttat 1140
 catttggctg gcaaggagat taaaaaaagg caagaaatcc aagagaagta tgaatgacct 1200
 atattaaatc gcccttgggt aaagaaaatt ctgggaatc taaaaatcat gagatccttt 1260
 aaatcttcc atgaaacgtt ttgtgtgggt gcacctcta cgtcaaact gaagtgtgtt 1320
 tcttcagtg catctggga gatttctacc tgaccaacag ttcttcagc ttccatttcg 1380
 cccctcatt atccctcaac cccagccca caggigtta tacagctcag cttttgtct 1440
 ttctgagga gaaacaaata agaccataaa gggaaaaggat tcatgtggaa tataaagatg 1500
 gctgacttgg ctctttcttg actcttgttt tcagittcaa ttcagtgctg tacttgatga 1560
 cagacacttc taaatgaagt gcaaatttga tacatatgtg aatatggact cagttttctt 1620
 gcagatcaaa tticagctcg tctctgtat acttggagg tacacttcta tagaaagttc 1680

10

20

30

40

aaaaagtcta cgctctccit tctttctaac tccagigaag taatggggc ctgctcaagt 1740
 tgaagagtc ctatttgcac ttagccctcg ccgctctga atgggacat cctatttaac 1800
 tggcttcagc ctccccacct tcttcagcca cctctctttt tcagtggct gacttcaca 1860
 cctagcaict catgagtgc aagcaaaagg agagaagaga gaaatagcct gcgctgtttt 1920
 ttagttggg ggttttgctg tttctttta tgagacccat tctatttct tatagtcaat 1980
 gtttctttta tcacgatatt attagtaaga aaacatcact gaaatgctag ctgcaagtga 2040
 catctcttg atgcatatg gaagagttaa aacagggtga gaaaticctt gattcacaat 2100
 gaaatgcct ccttccctt gccccagac cttttatcca cttacctaga ttctacatat 2160
 tctttaaatt tcactcagg cctccctcaa cccaccact tctttataa ctatgccttt 2220
 actaatcaa cccatgatga gctcctctc ctggcttctt actgaaagg taccctgtaa 2280
 catgcaattt tgcatttga taaagcctgc tttttaagt ttaa 2324

10

(210) 10

20

(211) 2398

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 10

ccgcagagga gccctggcca ggctagccag ggcccccga gcccctccc aggccgcgag 60
 cgccccctgc gcggtgctg gccctccctc ccagactgca gggacagcac ccggttaactg 120
 cgagtggagc ggaggaccg agcggctgag gagagaggag gcggcggtt agctgctacg 180
 ggttccggcc ggccctctc cgaggggggc tcaggaggag gaaggaggac ccgtgcgaga 240
 atgctctgc cctggagcct tgcctcccg ctgctgctt cctgggtggc aggtggtttc 300
 ggaacgcgg ccagtgaag gcatcacggg tigttagcat cggcacgta gcctgggtc 360
 tgtactatg gaactaaact ggctgctgc tacggctgga gaagaaacag caaggagtc 420
 tgtgaagcta catggaacc tggatgtaag ttgggtgagt gcgtgggacc aaacaaatgc 480
 agatgcttc caggatacac cgggaaaacc tgcagtcaag atgtgaatga gtgtggaatg 540
 aaaccccggc catgccaaca cagatgigt aalacacag gaagctacaa gtgcttttgc 600

30

40

ctacagtgcc acatgcicai gccagaigct acgigigtga actctaggac atgigccaig 660
 ataaacigtc agtacagctg tgaagacaca gaagaaggc cacagigcct gigtccatcc 720
 tcaggacicc gccigggccc aaatggaaga gacigictag atattgaiga atgigcctct 780
 ggtaaagica tctgtcccta caatcgaaga tgigigaaca catttggag ctactactgc 840
 aaatgicaca ttggtttcga actgcaatat atcagtggaac gatatgactg tatagataa 900
 aatgaatgta ctatggatag ccatacgtgc agccaccatg ccaattgctt caatacccaa 960
 gggctctica agtgtaaatg caagcagggg tataaaggca atggacttcg gigtctgct 1020
 atccctgaaa attctgtgaa ggaagtcctc agagcaccig gtaccatcaa agacagaatc 1080
 aagaagtigc ttgtcaciaa aacagcatg aaaaagaagg caaaaattaa aaatgttacc 1140
 ccagaacca ccaggactcc taccctaag gigaactigc agcccttcaa ctatgaagag 1200
 atagtittca gaggcgggaa cttcatgga ggtaaaaaag ggaatgaaga gaaaatgaaa 1260
 gaggggcttg aggatgagaa aagagaagag aaagccctga agaatgacat agaggagcga 1320
 agcctgcgag gagatgtgtt ttccctaag gigaatgaag caggtgaatt cggccigatt 1380
 ctggtcctaa ggaaagcgt aacttccaa ctggaacata aagatttaa tatctcggt 1440
 gacigcagct tcaatcatgg gatctgtgac tggaaacagg atagagaaga tgatttgac 1500
 tggatcctg ctgatcgaga taatgctatt ggcttctata tggcagttcc ggcttggca 1560
 ggtcacaaga aagacattgg ccgattgaaa ctctccctac ctgaccigca accccaaagc 1620
 aacttctgtt tgccttttga ttaccggctg gccggagaca aagtcgggaa acttcgagtg 1680
 ttigtgaaaa acagtaacaa tgccttggca tgggagaaga ccacgagiga ggaigaaaag 1740
 tggagacag ggaaaattca gtgtatcaa ggaactgatg ctaccaaag catcatttt 1800
 gaagcagaac gtggcaaggc caaaaccggc gaaatgcag tggatggcgt ctgtctgtt 1860
 tcaggcttat gtccagatag cttttatct gtggatgact gaatgttact atctttatat 1920
 ttgacttgt atgtcagttc cctggtttt ttgatattgc atcataggac ctctggcatt 1980
 ttagaattac tagctgaaaa attgtaatgt accaacagaa atattatgt aagatgcctt 2040
 tcttgataa gatatccaa tatttgcttt aaatatcata tcactgtatc ttctcagtca 2100
 ttctgaatc ttccacatt atattataaa atatggaaat gtcagtttat ctccctctct 2160
 cagtatact gatttgata agtaagtga tgagcttctc tctacaacat ttctagaaaa 2220
 tagaaaaaaa agcacagaga aatgtttaac tgttgactc ttatgatact tcttggaaac 2280
 tatgacatca aagatagact ttgcctaag tggcttagct gggctttca tagccaaact 2340

10

20

30

40

tgatatatta aattctttgt aataataata tccaaatcat caaaaaaaaa aaaaaaaaa 2398

(210) 11

(211) 1475

(212) DNA

(213) Homo sapiens

10

(400) 11

cccagaggag cagactacaa gaatggcaca cgctatggaa aactcctgga caatcagtaa 60
 agagtacat attgatgaag aagtgggctt tgcctgcca aatccacagg aaaatctacc 120
 tgattttiat aatgactgga tgttcattgc taaacatctg ccgatctca tagagtctgg 180
 ccagcttcga gaaagagtig agaagttaaa catgctcagc attgatcacc tcacagacca 240
 caagtcacag cgccctgcac gtctagtctt ggaagtcac accatggcat atgctgctgg 300
 caaaggctat ggagatgtcc gtaaggctt gccaaagaat atgctgctt ctactgcca 360
 actctccaag aaactggaac tgcctctat ttgggtttat gcagactgtg tctggcaaa 420
 ctggaagaaa aaggatccta ataagccct gacttatgag aacatggacg tttgttctc 480
 attctgcat ggagactgca gtaaaggatt ctctctggc tctctatgg tggaaatagc 540
 agctgcttct gcaatcaaag taattctac tgtattcaag gcaatgcaa tgcaagaacg 600
 ggacacttgc ctaaaggcgc tgttggaat agcttctgc ttggagaaag ccttcaagt 660
 gtttaccaa atccacgac atgigaacc aaaagcatt tttaggttc ttgcatata 720
 ttgtctggc tggaaaggca acccccagct atcagacggc ctgggtatg aagggttctg 780
 ggaagacca aaggagtig cagggggcag tgcaggccaa agcagcgtt tttaggtctt 840
 tgacgtctg ctgggcatcc agcagactgc tggggagga catgctgctc agttcttcca 900
 ggacatgaga agatataatg caccagctca caggaaactt ctgtgctat tagagtcaaa 960
 tccctcagtc cgtagatttg tcttttcaa aggtgatgtt ggcttgggg aagcttatga 1020
 cgctgtgtg aaagctctgg tctccctgag gagctacat ctgcaaatg tgactaagta 1080
 catctgatt cctgcaagcc agcagccaaa ggagaataag acctctgaag accttcaa 1140
 actggaagcc aaaggaactg gaggcactga tttaatgaat ttctgaaga ctgtaagaag 1200

20

30

40

tacaactgag aaatcccttt tgaaggaagg ttaaigtaac ccaacaagag cacatittat 1260
 catagcagag acatctgtat gcattccigt cattacccat igtaacagag ccacaaacta 1320
 atactatgca atgitttacc aataatgcaa tacaaaagac ccaaaaatc ctigtcattt 1380
 ctigtaggaa aacaacaaaa ggtaattatg tgaattata ctagaagttt tgaatctgt 1440
 atcttatcat tggataaaaa tgacattcaa taaat 1475

10

(210) 12

(211) 1639

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 12

agcagagcac acaagcttct aggacaagag ccaggaagaa accaccggaa ggaaccatct 60
 cactgttgtt aaacatgact tccaagctgg ccgtggctct ctiggcagcc ttcttgattt 120
 ctgcagctct gtgtgaaggt gcagttttgc caaggagtgc taaagaactt agatgtcagt 180
 gcataaagac atactccaaa ctttccacc ccaaatttat caaagaactg agagtgtttg 240
 agagtggacc acactgcgcc aacacagaaa ttatgttaa gctttctgat ggaagagagc 300
 tctgtctgga cccaaggaa aactgggtgc agagggtgtt ggagaagttt ttgaagaggg 360
 ctgagaattc ataaaaaat tcattctctg tggatccaa gaatcagiga agatgccagt 420
 gaaacttcaa gcaaatctac ttcaacactt catgtattgt gtgggtctgt tgtagggttg 480
 ccagatgcaa tacaagattc ctggttaaat ttgaatttca gtaaacaatg aatagttttt 540
 cattgtacca tgaaatatcc agaacatact tatagttaa gtattattta ttgaatcta 600
 caaaaaacaa caaataattt ttaaataaa ggattttcct agatattgca cgggagaata 660
 tacaaatagc aaaattgagc caaggccaa gagaatatcc gaactttaat ttcaggaatt 720
 gaatgggttt gctagaatgt gatattgaa gcatcacata aaaatgatgg gacaataaat 780
 ttgccataa agtcaaatit agctggaaat cctggatttt ttctgttaa atctggcaac 840
 cctagtctgc tagccaggat ccacaagtc ttgtccact gtgccctggg ttctcttta 900
 ttcttaagt gaaaaagtat tagccacat ctacctcac agtgatgttg tgaggacatg 960

20

30

40

tggagcact ttaagttttt tcatcataac ataaattatt ttcaagtgta acttattaac 1020
 ctatttatta ttatgtatt tatttaagca tcaaatattt gigaagaat tiggaaaaat 1080
 agaagatgaa tcatgattg aatagttata aagaigtat agtaaatita ttttattita 1140
 gatattaaat gatgttttat tagataaatt tcaatcaggg ttttagatt aaacaaagaa 1200
 acaatigggg acccagttaa attttcattt cagataaaca acaaatattt ttttagtata 1260
 agtacattat tgtttatctg aaagttttta ttgaactaac aatcctagtt tgatactccc 1320
 agtcttgica ttgccagctg tgttggtagt gcigigtiga attacggaat aatgagttag 1380
 aactattaaa acagccaaaa ctccacagtc aatattagta atttcttgct ggttgaaact 1440
 tgtttattat gtacaaatag attcttataa tattatttaa atgactgcat ttttaaatat 1500
 aaggctttat atttttaact ttaagatggt ttatgtgct ctccaaattt ttttactgt 1560
 ttcgatigt atggaaatat aaaagtaaat atgaaacatt taaaatataa ttgtgtgca 1620
 aagtaaaaaa aaaaaaaaaa 1639

10

20

(210) 13

(211) 4698

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 13

ctgccactct tctgcaacg gccaggagc tcagagctcc acatcigacc ttctagtcct 60
 gaccaggacc aggcagcac tctctctgtt cacagcctta gcaacttctc taggtttcaa 120
 ctggacaca gaggagctga cagccttcgg ttggacagc gctgggtttg gagacagcgt 180
 ggtccagtat gccaactcct ggttggttgt ttgagcccc caaaagataa cagctgcca 240
 ccaaacgggt ggctctacc agtgggcta cagcacttgt gccgtgagc ccatcggcct 300
 gcaggigccc ccggaggcgg tgaacatgtc cctgggctg tccctggcgt ctaccaccag 360
 ccttccag ctgctggcct gcggcccccac cgigcaccac gagtgcggga ggaacatgta 420
 cctcaccgga ctcgtcttcc tctgggccc caccagctc acccagaggc tcccggtgtc 480
 caggcaggag tgcccaagac aggagcagga catgtgttc ctgatgatg gctcaggcag 540

30

40

catctccicc cgcaactttg ccacgaigat gaacttcgtg agagctgtga taagccagtt 600
 ccagagaccc agcaccaggt ttccctgat gcagttctcc aacaaattcc aaacacactt 660
 cactttcgag gaattcaggc gcacgtcaaa cccctcagc ctgttggctt ctgttcacca 720
 gctgcaaggg ttacataca cggccaccgc catccaaaat gtcgtgcacc gatgtttcca 780
 tgcctcatat gggcccgta gggatgccac caaaattctc atgttcata ctgatgggaa 840
 gaaagaaggc gacagcctgg attataagga tgcattccc atggctgatg cagcaggcat 900
 catccgtat gcaattgggg ttggattagc ttitcaaac agaaattctt ggaaagaatt 960
 aatgacatt gcatcgaagc cctcccagga acacatatt aaagtggagg actttgatgc 1020
 tctgaaagat attcaaac aactgaagga gaagatctt gccattgagg gtacggagac 1080
 cacaagcagt agctccttcg aattggagat ggcacaggag ggccttcagc ctgtgttcac 1140
 acctgatggc cccgttctgg ggcctgtggg gagcttcacc tggcttggag gtgccttctt 1200
 gtacccccca aatatgagcc ctacctcat caacatgtct caggagaatg tggacatgag 1260
 ggactcttac ctgggttact ccaccgagct ggcctctgg aaaggggic agagcctgg 1320
 cctgggggccc cccgctacc agcacaccgg gaaggctgtc atcttcaccc aggtgtccag 1380
 gcaatggagg atgaaggccg aagtcacggg gactcagatc ggctcctact tggggccctc 1440
 cctctgtccc gtggacgtag acaccgacgg cagcaccgac ctggtcctca tggggcccc 1500
 ccattactac gagcagaccc gagggggcca gggtctgtg tgtccctgc ccagggggig 1560
 gagaaggagg tgggtgtgat ctgttctcta cgggagcag ggcacccct ggggtcgtt 1620
 tggggggct ctgacagtc tggggatgt gaatggggac aagctgacag acgtgtcat 1680
 cggggcccca ggagaggagg agaaccgggg tctgtctac ctgttcacg gactcttggg 1740
 acccagcatc agccctccc acagccagcg gatcggggc tcccagctt cctccaggct 1800
 gcagtatttt gggcaggcac tgagcgggg tcaagacctc acccaggatg gactgggtga 1860
 cctggctgtg gggggccggg gccagggtct cctgtcagg accagacctg tgcctgggt 1920
 ggggtgagc atgcagtca tacttgcca gatccccagg tctgcgttg agtgtcggga 1980
 gcagggtgtc tctgagcaga cctgggtaca gtccaacatc tgcctttaca tggacaaacg 2040
 ttctaagaac ctgcttggga gccgtgacct ccaaagctct gtgaccttgg acctggccct 2100
 cgacctggc cgcctgagtc cccgtgccac ctccaggaa acaaagaacc ggagctgag 2160
 ccgagtcga gtctcgggc tgaaggcaca ctgtgaaaac ttcaacctgc tgcctccgag 2220
 ctgcgtggag gactctgtga ccccatlac ctgtgtctg aacttcacgc tgggggcaa 2280

10

20

30

40

gccccicctt gccttcagaa acctgcggcc tatgctggcc gcactggctc agagatactt 2340
 cacggccicc ctaccctttg agaagaactg tggagccgac catatctgcc aggacaatct 2400
 cggcaicicc ttcagcttcc caggcttgaa gtccctgctg gtgggagta acctggagct 2460
 gaacgcagaa gtgatgggtt ggaatgacgg ggaagactcc tacggaacca ccatcaccit 2520
 ctcccacccc gcaggactgt cctaccgcta cgtggcagag ggccagaaac aagggcagct 2580
 gcgttccctg caccigacat gtgacagcgc cccagtggg agccagggca cctggagcac 2640
 cagctgcaga atcaaccacc tcattctcgg tggcggcgcc cagatcacct tcttggctac 2700
 ctttgacgtc tccccaagg ctgtcctggg agaccggctg cttctgacag ccaatgtgag 2760
 cagtgagaac aacaticcca ggaccagcaa gaccaccitc cagctggagc tcccggtgaa 2820
 gtatgctgtc tacactgtgg ttagcagcca cgaacaattc accaaatacc tcaacttctc 2880
 agagctctgag gagaaggaaa gccatgtggc calgcacaga taccaggica ataacctggg 2940
 acagagggac ctgctgttca gcatcaactt ctgggtgctt gtggagctga accaggaggc 3000
 tgtgtggatg gatgtggagg tctccaccc ccagaacca tcccttcggt gctctcaga 3060
 gaaaatcgca cccccagcat ctgacttctt ggcgcacatt cagaagaatc ccgtgctgga 3120
 ctgctccatt gctggctgcc tgcggttccg ctgtgacgtc ccttcttca gcgtccagga 3180
 ggagctggat ttaccctga agggcaacct cagcttggc tgggtccgc agatattgca 3240
 gaagaagggt tgggtctga gtgtggctga aattacgtt gacacatccg tgtactcca 3300
 gcttccagga caggaggcat ttaigagagc tcagacgaca acgggtctgg agaagtacaa 3360
 ggtccacaac cccaccccc tcatcgtagg cagctccatt ggggtctgt tgcgtctggc 3420
 actcatcaca gcggtactgt acaaagtgg ctcttcaag cgtcagtaca aggaaatgat 3480
 ggaggaggca aatggacaaa ttgccccaga aaacgggaca cagacccca gcccgccag 3540
 tgagaaaiga tccctctttg ccttggactt ctctccgc gattttccc acttacttac 3600
 cctcaccigt caggctgacg gggaggaacc atgcaccac cgagagaggc tgggatgggc 3660
 ctgcttccctg tcttgggag aaaacgtctt gcttgggaag gggccttgt ctgtcaagg 3720
 ttccaactgg aaaccctag gacagggtcc ctgctgtgt ccccaaaagg acttgacttg 3780
 caatttctac ctagaaatac atggacaata cccccaggcc tcagtctccc ttctccatg 3840
 aggcacgaat gatcttctt tctttctt tttttttt ttctttctt tttttttt 3900
 tttgagacgg agtctcgtc tgtcaccag gcgtggagtc aatggcgtga tctcggtcg 3960
 ctgcaacctc cgcttccgg gttaagtaa tctgtctgtc tcagcttctt gcgtagctgg 4020

10

20

30

40

gactacaggc acacgccacc tcgcccggcc cgatctttct aaaatacagt tcigaataig 4080
 ctgtctatcc ccacctgtct tcaacagctc ccattaccc tcaggacaat gtcigaactc 4140
 tccagcttcg cgtgagaagt ccccttccat ccagagggt gggttcagg gcgcacagca 4200
 tgagagcctc tgtgccccca tcacctcgt ttcagtgaa ttagtgicat gtcagcatca 4260
 gctcagggt tcatcgtgg gctctcagtt ccgattcccc aggtcgaatt ggagtgaga 4320
 tgcctgcatg ctgggttcig cacagctggc ctcccgggt tgggtcaaca ttgtggcct 4380
 ggaaggagg agcgccctct agggaggac atggccccgg tgcggctgca gctcaccagc 4440
 cccaggcca gaagagaccc aaccacttcc tatitttga ggctatgaat atagtaccig 4500
 aaaaaatgcc aagcactaga ttatittttt aaaaagcgta ctttaaagt ttgigttaat 4560
 acacattaaa acatgcaca aaaacgatgc atctaccgt ccttgggaaa taatctgaaa 4620
 ggtctaaaaa taaaaagcc ttctgtggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4680
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4698

10

20

(210) 14

(211) 2600

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 14

ggaiccaaag gagacctata gtagctcca ggagctctta gtagcaagt gaaggtaact 60
 gtggggctca ttgtgcccatt tgcctttca ctgctttcaa ctggtagttg tgggtgaag 120
 cactggacaa tgccacatac ttgtggatg gtaggggtct tggggctcat catcagctc 180
 tccaagggaag aatcttcaa tcaggcttct ctgtcttggt accgcaatgg tatctgcaag 240
 ggcagctcag gatctttaaa ctccattccc tcagggtca cagaagctgt aaaaagcctt 300
 gacctgtcca acaacaggat cacctacatt agcaacagtg acctacagag gtgtgtgaac 360
 ctccaggctc tgggtgtgac atccaatgga attaacacaa tagaggaaga ttcttttct 420
 tccctggcca gtcttgaaca tttagactta tctataatt acttatctaa ttatctgtct 480
 tcttgggtca agcccccttc ttctttaaca ttcttaaact tactgggaaa tctttacaaa 540

30

40

accctagggg aaacatctct ttttctcat ctacaaaaat tgcaaatcct gagagtggga 600
 aatatggaca ctttactaa gattcaaaga aaagattitg ctggacttac cttccttgag 660
 gaacttgaga ttgatgcttc agatctacag agctatgagc caaaaagitt gaagtcaatt 720
 cagaacgiaa gtcatctgat cttcataatg aagcagcata ttttactgct ggagattttt 780
 gtagatgita caagttccgt ggaatgittg gaacigcgag atactgattt ggacactttc 840
 catttttcag aactatccac tggigaaaca aattcatiga ttaaaaagtt tacatttga 900
 aatgigaaaa tcaccgatga aagtttgitt caggitatga aactttigaa tcagatttct 960
 ggatgttiag aattagagtt tgatgactgt accctaatg gagttggtaa ttttagagca 1020
 tctgataatg acagagttat agatccaggt aaagiggaaa cgtaacaat ccggaggctg 1080
 cataatccaa ggttttactt attttatgat ctgagcactt tatatttact tacagaaaga 1140
 gttaaaagaa tcacagtaga aaacagtaaa gttttcttgg ttcttgittt actttcaca 1200
 catttaaaat cattagaata ctggatctc agigaaaatt tgatggitga agaatacttg 1260
 aaaaattcag cctgtgagga tgccctggccc tctctacaaa ctttaatttt aaggcaaaat 1320
 catttggcat catiggaaaa aaccggagag acttggctca ctctgaaaaa ctigactaac 1380
 attgataica gtaagaatag ttttacttct atgccigaaa ctgttcagt gccagaaaag 1440
 atgaaatatt tgaacttate cagcacacga atacacagt taacaggctg caticccaag 1500
 acactggaaa ttttagatgt tagcaacaac aatcicaatt tattttcttt gaatttgccg 1560
 caactcaag aactttatat ttccagaaat aagtigatga ctctaccaga tgcttccctc 1620
 ttaccaatgt tactagtatt gaaaatcagt aggaatgcaa taactacgtt ttctaaggag 1680
 caactigact catttcacac actgaagact ttggaagctg gtggcaataa cttcatttgc 1740
 tcttgigaat tctctctct cactcaggag cagcaagcac tggccaaagt ctgtattgat 1800
 tggccagcaa attacctgtg tgactctcca tcccatgtgc gtggccagca ggttcaggat 1860
 gtccgctct cgggttcgga atgtcacagg acagcactgg tgtctggcat gtgctgtgct 1920
 ctgttccigc tgatcctgct cacgggggtc ctgtgccacc gtttccatgg cctgtggtat 1980
 atgaaaaiga tgtgggctg gctccaggcc aaaaggaagc ccaggaaagc tcccagcagg 2040
 aacatctgct atgatgcatt tgtttcttac agtgagcggg atgcctactg ggtggagaac 2100
 ctatggicc aggagctgga gaacttcaat ccccccctca agttgtgtct tcataagcgg 2160
 gacttcattc ctggcaagt gatcattgac aatacattg actccattga aaagagccac 2220
 aaaacigtct ttgtgccttc tgaaaacttt gigaagagt agtggigcaa gtaigaactg 2280

10

20

30

40

gacttctccc atttccgtct ttttgaagag aacaatgatg ctgccattct catctttctg 2340
 gagcccatig agaaaaaagc cattccccag cgcttcigca agctgcggaa gataatgaac 2400
 accaagacct acctggagig gcccatggac gaggcicagc ggaaggatt tgggtaaat 2460
 ctgagagctg cgataaagtc ctaggttccc atatitaaga ccagtcittg tctagttggg 2520
 atctttaigt cactagitat agttaagtic attcagacat aattatataa aaactacgtg 2580
 gatgtaccgt catttgagga 2600

10

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

20

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30

Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45

30

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80

40

Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125

10

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140

Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
 145 150 155 160

20

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190

30

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
 225 230

40

<210> 16

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

10

Met Lys Lys Ser Gly Val Leu Phe Leu Leu Gly Ile Ile Leu Leu Val
1 5 10 15

Leu Ile Gly Val Gln Gly Thr Pro Val Val Arg Lys Gly Arg Cys Ser
20 25 30

Cys Ile Ser Thr Asn Gln Gly Thr Ile His Leu Gln Ser Leu Lys Asp
35 40 45

20

Leu Lys Gln Phe Ala Pro Ser Pro Ser Cys Glu Lys Ile Glu Ile Ile
50 55 60

Ala Thr Leu Lys Asn Gly Val Gln Thr Cys Leu Asn Pro Asp Ser Ala
65 70 75 80

30

Asp Val Lys Glu Leu Ile Lys Lys Trp Glu Lys Gln Val Ser Gln Lys
85 90 95

Lys Lys Gln Lys Asn Gly Lys Lys His Gln Lys Lys Lys Val Leu Lys
100 105 110

40

Val Arg Lys Ser Gln Arg Ser Arg Gln Lys Lys Thr Thr
 115 120 125

<210> 17

<211> 850

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Arg Gln Val Cys Cys Ser Ala Leu Pro Pro Pro Pro Leu Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Arg Cys Ser Ser Tyr Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Arg
 20 25 30

20

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ser Gly Ser Ser Ser Arg
 35 40 45

Ser Ser Ser Asn Asn Ser Ser Ile Ser Arg Pro Ala Ala Pro Pro Glu
 50 55 60

30

Pro Arg Pro Gln Gln Gln Pro Gln Pro Arg Ser Pro Ala Ala Arg Arg
 65 70 75 80

Ala Ala Ala Arg Ser Arg Ala Ala Ala Ala Gly Gly Met Arg Arg Asp
 85 90 95

40

Pro Ala Pro Gly Phe Ser Met Leu Leu Phe Gly Val Ser Leu Ala Cys

100	105	110	
Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Gln Asp Gln Ala Tyr Lys Ala Pro			
115	120	125	
Val Val Val Glu Gly Lys Val Gln Gly Leu Val Pro Ala Gly Gly Ser			
130	135	140	10
Ser Ser Asn Ser Thr Arg Glu Pro Pro Ala Ser Gly Arg Val Ala Leu			
145	150	155	160
Val Lys Val Leu Asp Lys Trp Pro Leu Arg Ser Gly Gly Leu Gln Arg			
165	170	175	20
Glu Gln Val Ile Ser Val Gly Ser Cys Val Pro Leu Glu Arg Asn Gln			
180	185	190	
Arg Tyr Ile Phe Phe Leu Glu Pro Thr Glu Gln Pro Leu Val Phe Lys			
195	200	205	
Thr Ala Phe Ala Pro Leu Asp Thr Asn Gly Lys Asn Leu Lys Lys Glu			30
210	215	220	
Val Gly Lys Ile Leu Cys Thr Asp Cys Ala Thr Arg Pro Lys Leu Lys			
225	230	235	240
Lys Met Lys Ser Gln Thr Gly Gln Val Gly Glu Lys Gln Ser Leu Lys			
245	250	255	40

Cys Glu Ala Ala Ala Gly Asn Pro Gln Pro Ser Tyr Arg Trp Phe Lys

260

265

270

Asp Gly Lys Glu Leu Asn Arg Ser Arg Asp Ile Arg Ile Lys Tyr Gly

275

280

285

Asn Gly Arg Lys Asn Ser Arg Leu Gln Phe Asn Lys Val Lys Val Glu

290

295

300

10

Asp Ala Gly Glu Tyr Val Cys Glu Ala Glu Asn Ile Leu Gly Lys Asp

305

310

315

320

Thr Val Arg Gly Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Ser Thr Thr Leu Ser

325

330

335

20

Ser Trp Ser Gly His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr Ala Lys Ser Tyr

340

345

350

Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly Ile Asn Gln Leu

355

360

365

30

Ser Cys Lys Cys Pro Asn Gly Phe Phe Gly Gln Arg Cys Leu Glu Lys

370

375

380

Leu Pro Leu Arg Leu Tyr Met Pro Asp Pro Lys Gln Lys Ala Glu Glu

385

390

395

400

Leu Tyr Gln Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile Cys Val Ala Leu

405

410

415

40

Leu Val Val Gly Ile Val Cys Val Val Ala Tyr Cys Lys Thr Lys Lys
 420 425 430

Gln Arg Lys Gln Met His Asn His Leu Arg Gln Asn Met Cys Pro Ala
 435 440 445

His Gln Asn Arg Ser Leu Ala Asn Gly Pro Ser His Pro Arg Leu Asp
 450 455 460

Pro Glu Glu Ile Gln Met Ala Asp Tyr Ile Ser Lys Asn Val Pro Ala
 465 470 475 480

Thr Asp His Val Ile Arg Arg Glu Thr Glu Thr Thr Phe Ser Gly Ser
 485 490 495

His Ser Cys Ser Pro Ser His His Cys Ser Thr Ala Thr Pro Thr Ser
 500 505 510

Ser His Arg His Glu Ser His Thr Trp Ser Leu Glu Arg Ser Glu Ser
 515 520 525

Leu Thr Ser Asp Ser Gln Ser Gly Ile Met Leu Ser Ser Val Gly Thr
 530 535 540

Ser Lys Cys Asn Ser Pro Ala Cys Val Glu Ala Arg Ala Arg Arg Ala
 545 550 555 560

Ala Ala Tyr Asn Leu Glu Glu Arg Arg Arg Ala Thr Ala Pro Pro Tyr

10

20

30

40

565	570	575	
His Asp Ser Val Asp Ser Leu Arg Asp Ser Pro His Ser Glu Arg Tyr			
580	585	590	
Val Ser Ala Leu Thr Thr Pro Ala Arg Leu Ser Pro Val Asp Phe His			
595	600	605	10
Tyr Ser Leu Ala Thr Gln Val Pro Thr Phe Glu Ile Thr Ser Pro Asn			
610	615	620	
Ser Ala His Ala Val Ser Leu Pro Pro Ala Ala Pro Ile Ser Tyr Arg			
625	630	635	20
Leu Ala Glu Gln Gln Pro Leu Leu Arg His Pro Ala Pro Pro Gly Pro			
645	650	655	
Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Ala Asp Met Gln Arg			
660	665	670	
Ser Tyr Asp Ser Tyr Tyr Tyr Pro Ala Ala Gly Pro Gly Pro Arg Arg			30
675	680	685	
Gly Thr Cys Ala Leu Gly Gly Ser Leu Gly Ser Leu Pro Ala Ser Pro			
690	695	700	
Phe Arg Ile Pro Glu Asp Asp Glu Tyr Glu Thr Thr Gln Glu Cys Ala			
705	710	715	40
		720	

Pro Pro Pro Pro Pro Arg Pro Arg Ala Arg Gly Ala Ser Arg Arg Thr
 725 730 735

Ser Ala Gly Pro Arg Arg Trp Arg Arg Ser Arg Leu Asn Gly Leu Ala
 740 745 750

Ala Gln Arg Ala Arg Ala Ala Arg Asp Ser Leu Ser Leu Ser Ser Gly
 755 760 765

10

Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ala Ser Asp Asp Asp Ala Asp Asp Ala
 770 775 780

Asp Gly Ala Leu Ala Ala Glu Ser Thr Pro Phe Leu Gly Leu Arg Gly
 785 790 795 800

20

Ala His Asp Ala Leu Arg Ser Asp Ser Pro Pro Leu Cys Pro Ala Ala
 805 810 815

Asp Ser Arg Thr Tyr Tyr Ser Leu Asp Ser His Ser Thr Arg Ala Ser
 820 825 830

30

Ser Arg His Ser Arg Gly Pro Pro Pro Arg Ala Lys Gln Asp Ser Ala
 835 840 845

Pro Leu
 850

40

<211> 923

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Asp Ser Ile Gly Ser Ser Gly Leu Arg Gln Gly Glu Glu Thr Leu

1

5

10

15

10

Ser Cys Ser Glu Glu Gly Leu Pro Gly Pro Ser Asp Ser Ser Glu Leu

20

25

30

Val Gln Glu Cys Leu Gln Gln Phe Lys Val Thr Arg Ala Gln Leu Gln

35

40

45

20

Gln Ile Gln Ala Ser Leu Leu Gly Ser Met Glu Gln Ala Leu Arg Gly

50

55

60

Gln Ala Ser Pro Ala Pro Ala Val Arg Met Leu Pro Thr Tyr Val Gly

65

70

75

80

Ser Thr Pro His Gly Thr Glu Gln Gly Asp Phe Val Val Leu Glu Leu

85

90

95

30

Gly Ala Thr Gly Ala Ser Leu Arg Val Leu Trp Val Thr Leu Thr Gly

100

105

110

Ile Glu Gly His Arg Val Glu Pro Arg Ser Gln Glu Phe Val Ile Pro

115

120

125

40

Gln Glu Val Met Leu Gly Ala Gly Gln Gln Leu Phe Asp Phe Ala Ala
 130 135 140

His Cys Leu Ser Glu Phe Leu Asp Ala Gln Pro Val Asn Lys Gln Gly
 145 150 155 160

Leu Gln Leu Gly Phe Ser Phe Ser Phe Pro Cys His Gln Thr Gly Leu
 165 170 175

10

Asp Arg Ser Thr Leu Ile Ser Trp Thr Lys Gly Phe Arg Cys Ser Gly
 180 185 190

Val Glu Gly Gln Asp Val Val Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ile Arg Arg
 195 200 205

20

Gln Gly Ala Tyr Asn Ile Asp Val Val Ala Val Val Asn Asp Thr Val
 210 215 220

Gly Thr Met Met Gly Cys Glu Pro Gly Val Arg Pro Cys Glu Val Gly
 225 230 235 240

30

Leu Val Val Asp Thr Gly Thr Asn Ala Cys Tyr Met Glu Glu Ala Arg
 245 250 255

His Val Ala Val Leu Asp Glu Asp Arg Gly Arg Val Cys Val Ser Val
 260 265 270

Glu Trp Gly Ser Leu Ser Asp Asp Gly Ala Leu Gly Pro Val Leu Thr
 275 280 285

40

Thr Phe Asp His Thr Leu Asp His Glu Ser Leu Asn Pro Gly Ala Gln
 290 295 300

Arg Phe Glu Lys Met Ile Gly Gly Leu Tyr Leu Gly Glu Leu Val Arg
 305 310 315 320

Leu Val Leu Ala His Leu Ala Arg Cys Gly Val Leu Phe Gly Gly Cys
 325 330 335

Thr Ser Pro Ala Leu Leu Ser Gln Gly Ser Ile Leu Leu Glu His Val
 340 345 350

Ala Glu Met Glu Asp Pro Ser Thr Gly Ala Ala Arg Val His Ala Ile
 355 360 365

Leu Gln Asp Leu Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ser Asp Val Glu Leu Val
 370 375 380

Gln His Val Cys Ala Ala Val Cys Thr Arg Ala Ala Gln Leu Cys Ala
 385 390 395 400

Ala Ala Leu Ala Ala Val Leu Ser Cys Leu Gln His Ser Arg Glu Gln
 405 410 415

Gln Thr Leu Gln Val Ala Val Ala Thr Gly Gly Arg Val Cys Glu Arg
 420 425 430

His Pro Arg Phe Cys Ser Val Leu Gln Gly Thr Val Met Leu Leu Ala

10

20

30

40

435	440	445	
Pro Glu Cys Asp Val Ser Leu Ile Pro Ser Val Asp Gly Gly Gly Arg			
450	455	460	
Gly Val Ala Met Val Thr Ala Val Ala Ala Arg Leu Ala Ala His Arg			
465	470	475	480
			10
Arg Leu Leu Glu Glu Thr Leu Ala Pro Phe Arg Leu Asn His Asp Gln			
485	490	495	
Leu Ala Ala Val Gln Ala Gln Met Arg Lys Ala Met Ala Lys Gly Leu			
500	505	510	
			20
Arg Gly Glu Ala Ser Ser Leu Arg Met Leu Pro Thr Phe Val Arg Ala			
515	520	525	
Thr Pro Asp Gly Ser Glu Arg Gly Asp Phe Leu Ala Leu Asp Leu Gly			
530	535	540	
Gly Thr Asn Phe Arg Val Leu Leu Val Arg Val Thr Thr Gly Val Gln			
545	550	555	560
			30
Ile Thr Ser Glu Ile Tyr Ser Ile Pro Glu Thr Val Ala Gln Gly Ser			
565	570	575	
Gly Gln Gln Leu Phe Asp His Ile Val Asp Cys Ile Val Asp Phe Gln			
580	585	590	
			40

Gln Lys Gln Gly Leu Ser Gly Gln Ser Leu Pro Leu Gly Phe Thr Phe
595 600 605

Ser Phe Pro Cys Arg Gln Leu Gly Leu Asp Gln Gly Ile Leu Leu Asn
610 615 620

Trp Thr Lys Gly Phe Lys Ala Ser Asp Cys Glu Gly Gln Asp Val Val
625 630 635 640

10

Ser Leu Leu Arg Glu Ala Ile Thr Arg Arg Gln Ala Val Glu Leu Asn
645 650 655

Val Val Ala Ile Val Asn Asp Thr Val Gly Thr Met Met Ser Cys Gly
660 665 670

20

Tyr Glu Asp Pro Arg Cys Glu Ile Gly Leu Ile Val Gly Thr Gly Thr
675 680 685

Asn Ala Cys Tyr Met Glu Glu Leu Arg Asn Val Ala Gly Val Pro Gly
690 695 700

30

Asp Ser Gly Arg Met Cys Ile Asn Met Glu Trp Gly Ala Phe Gly Asp
705 710 715 720

Asp Gly Ser Leu Ala Met Leu Ser Thr Arg Phe Asp Ala Ser Val Asp
725 730 735

Gln Ala Ser Ile Asn Pro Gly Lys Gln Arg Phe Glu Lys Met Ile Ser
740 745 750

40

Gly Met Tyr Leu Gly Glu Ile Val Arg His Ile Leu Leu His Leu Thr
755 760 765

Ser Leu Gly Val Leu Phe Arg Gly Gln Gln Ile Gln Arg Leu Gln Thr
770 775 780

Arg Asp Ile Phe Lys Thr Lys Phe Leu Ser Glu Ile Glu Ser Asp Ser
785 790 795 800

Leu Ala Leu Arg Gln Val Arg Ala Ile Leu Glu Asp Leu Gly Leu Pro
805 810 815

Leu Thr Ser Asp Asp Ala Leu Met Val Leu Glu Val Cys Gln Ala Val
820 825 830

Ser Gln Arg Ala Ala Gln Leu Cys Gly Ala Gly Val Ala Ala Val Val
835 840 845

Glu Lys Ile Arg Gly Asn Arg Gly Leu Glu Glu Leu Ala Val Ser Val
850 855 860

Gly Val Asp Gly Thr Leu Tyr Lys Leu His Pro Arg Phe Ser Ser Leu
865 870 875 880

Val Ala Ala Thr Val Arg Glu Leu Ala Pro Arg Cys Val Val Thr Phe
885 890 895

Leu Gln Ser Glu Asp Gly Ser Gly Lys Gly Ala Ala Leu Val Thr Ala

10

20

30

40

900

905

910

Val Ala Cys Arg Leu Ala Gln Leu Thr Arg Val

915

920

<210> 19

10

<211> 387

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Asn Arg His His Leu Gln Asp His Phe Leu Glu Ile Asp Lys Lys

1

5

10

15

20

Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Asp Phe Ile Ala Lys Val Leu Pro Pro

20

25

30

Val Leu Gly Leu Glu Phe Ile Phe Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Ala

35

40

45

30

Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile

50

55

60

Phe Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu

65

70

75

80

Pro Phe Val Met Asp Tyr Tyr Val Arg Arg Ser Asp Trp Asn Phe Gly

85

90

95

40

Asp Ile Pro Cys Arg Leu Val Leu Phe Met Phe Ala Met Asn Arg Gln
 100 105 110

Gly Ser Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg
 115 120 125

Val Val His Pro His His Ala Leu Asn Lys Ile Ser Asn Trp Thr Ala
 130 135 140

Ala Ile Ile Ser Cys Leu Leu Trp Gly Ile Thr Val Gly Leu Thr Val
 145 150 155 160

His Leu Leu Lys Lys Lys Leu Leu Ile Gln Asn Gly Pro Ala Asn Val
 165 170 175

Cys Ile Ser Phe Ser Ile Cys His Thr Phe Arg Trp His Glu Ala Met
 180 185 190

Phe Leu Leu Glu Phe Leu Leu Pro Leu Gly Ile Ile Leu Phe Cys Ser
 195 200 205

Ala Arg Ile Ile Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Arg Ala Ile Thr Phe Ile Met Val Val Ala Ile Val Phe
 225 230 235 240

Val Ile Cys Phe Leu Pro Ser Val Val Val Arg Ile Arg Ile Phe Trp

10

20

30

40

245	250	255	
Leu Leu His Thr Ser Gly Thr Gln Asn Cys Glu Val Tyr Arg Ser Val			
260	265	270	
Asp Leu Ala Phe Phe Ile Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met			
275	280	285	10
Leu Asp Pro Val Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe			
290	295	300	
Phe Ser Thr Leu Ile Asn Arg Cys Leu Gln Arg Lys Met Thr Gly Glu			
305	310	315	20
Pro Asp Asn Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Asp Pro Asn			
325	330	335	
Lys Thr Arg Gly Ala Pro Glu Ala Leu Met Ala Asn Ser Gly Glu Pro			
340	345	350	
Trp Ser Pro Ser Tyr Leu Gly Pro Thr Ser Asn Asn His Ser Lys Lys			30
355	360	365	
Gly His Cys His Gln Glu Pro Ala Ser Leu Glu Lys Gln Leu Gly Cys			
370	375	380	
Cys Ile Glu			
385			40

<210> 20

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

10

Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu Ser

1

5

10

15

Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu Pro Gln Arg Glu

20

25

30

Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly

20

35

40

45

Ser His Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala

50

55

60

Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu

65

70

75

80

30

Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys Ser Ile Gly

85

90

95

Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly

100

105

110

40

Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met

115	120	125	
Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly			
130	135	140	
His Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp Lys Asp			
145	150	155	160
			10
Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Thr Asp			
	165	170	175
<210> 21			
<211> 206			20
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 21			
Met Ala Leu Pro Cys Thr Leu Gly Leu Gly Met Leu Leu Ala Leu Pro			
1	5	10	15
			30
Gly Ala Leu Gly Ser Gly Gly Ser Ala Glu Asp Ser Val Gly Ser Ser			
	20	25	30
Ser Val Thr Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Thr			
	35	40	45
Gly Leu Ala Leu Ala Trp Arg Arg Leu Ser Arg Asp Ser Gly Gly Tyr			
50	55	60	40

Tyr His Pro Ala Arg Leu Gly Ala Ala Leu Trp Gly Arg Thr Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Leu Trp Ala Ser Pro Pro Gly Arg Trp Leu Gln Ala Arg Ala Glu
 85 90 95

Leu Gly Ser Thr Asp Asn Asp Leu Glu Arg Gln Glu Asp Glu Gln Asp
 100 105 110

Thr Asp Tyr Asp His Val Ala Asp Gly Gly Leu Gln Ala Asp Pro Gly
 115 120 125

Glu Gly Glu Gln Gln Cys Gly Glu Ala Ser Ser Pro Glu Gln Val Pro
 130 135 140

Val Arg Ala Glu Glu Ala Arg Asp Ser Asp Thr Glu Gly Asp Leu Val
 145 150 155 160

Leu Gly Ser Pro Gly Pro Ala Ser Ala Gly Gly Ser Ala Glu Ala Leu
 165 170 175

Leu Ser Asp Leu His Ala Phe Ala Gly Ser Ala Ala Trp Asp Asp Ser
 180 185 190

Ala Arg Ala Ala Gly Gly Gln Gly Leu His Val Thr Ala Leu
 195 200 205

10

20

30

40

<210> 22

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Lys Leu Cys Val Thr Val Leu Ser Leu Leu Met Leu Val Ala Ala

10

1

5

10

15

Phe Cys Ser Pro Ala Leu Ser Ala Pro Met Gly Ser Asp Pro Pro Thr

20

25

30

Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ala Arg Lys Leu Pro Arg Asn Phe Val

35

40

45

20

Val Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser Ser Leu Cys Ser Gln Pro Ala Val Val

50

55

60

Phe Gln Thr Lys Arg Ser Lys Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser

65

70

75

80

30

Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr Asp Leu Glu Leu Asn

85

90

<210> 23

<211> 372

<212> PRT

40

<213> Homo sapiens

(400) 23

Met Ile Phe Pro Trp Lys Cys Gln Ser Thr Gln Arg Asp Leu Trp Asn
 1 5 10 15

Ile Phe Lys Leu Trp Gly Trp Thr Met Leu Cys Cys Asp Phe Leu Ala
 20 25 30

10

His His Gly Thr Asp Cys Trp Thr Tyr His Tyr Ser Glu Lys Pro Met
 35 40 45

Asn Trp Gln Arg Ala Arg Arg Phe Cys Arg Asp Asn Tyr Thr Asp Leu
 50 55 60

20

Val Ala Ile Gln Asn Lys Ala Glu Ile Glu Tyr Leu Glu Lys Thr Leu
 65 70 75 80

Pro Phe Ser Arg Ser Tyr Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Ile Gly Gly
 85 90 95

Ile Trp Thr Trp Val Gly Thr Asn Lys Ser Leu Thr Glu Glu Ala Glu
 100 105 110

30

Asn Trp Gly Asp Gly Glu Pro Asn Asn Lys Lys Asn Lys Glu Asp Cys
 115 120 125

Val Glu Ile Tyr Ile Lys Arg Asn Lys Asp Ala Gly Lys Trp Asn Asp
 130 135 140

40

Asp Ala Cys His Lys Leu Lys Ala Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys
 145 150 155 160

Gln Pro Trp Ser Cys Ser Gly His Gly Glu Cys Val Glu Ile Ile Asn
 165 170 175

Asn Tyr Thr Cys Asn Cys Asp Val Gly Tyr Tyr Gly Pro Gln Cys Gln
 180 185 190

10

Phe Val Ile Gln Cys Glu Pro Leu Glu Ala Pro Glu Leu Gly Thr Met
 195 200 205

Asp Cys Thr His Pro Leu Gly Asn Phe Ser Phe Ser Ser Gln Cys Ala
 210 215 220

20

Phe Ser Cys Ser Glu Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ile Glu Glu Thr Thr
 225 230 235 240

Cys Gly Pro Phe Gly Asn Trp Ser Ser Pro Glu Pro Thr Cys Gln Val
 245 250 255

30

Ile Gln Cys Glu Pro Leu Ser Ala Pro Asp Leu Gly Ile Met Asn Cys
 260 265 270

Ser His Pro Leu Ala Ser Phe Ser Phe Thr Ser Ala Cys Thr Phe Ile
 275 280 285

Cys Ser Glu Gly Thr Glu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Thr Ile Cys Glu
 290 295 300

40

Ser Ser Gly Ile Trp Ser Asn Pro Ser Pro Ile Cys Gln Lys Leu Asp
 305 310 315 320

Lys Ser Phe Ser Met Ile Lys Glu Gly Asp Tyr Asn Pro Leu Phe Ile
 325 330 335

Pro Val Ala Val Met Val Thr Ala Phe Ser Gly Leu Ala Phe Ile Ile
 340 345 350

Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Lys Gly Lys Lys Ser Lys Arg Ser Met
 355 360 365

Asn Asp Pro Tyr
 370

<210> 24

<211> 553

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Pro Leu Pro Trp Ser Leu Ala Leu Pro Leu Leu Leu Ser Trp Val
 1 5 10 15

Ala Gly Gly Phe Gly Asn Ala Ala Ser Ala Arg His His Gly Leu Leu
 20 25 30

Ala Ser Ala Arg Gln Pro Gly Val Cys His Tyr Gly Thr Lys Leu Ala
 35 40 45

Cys Cys Tyr Gly Trp Arg Arg Asn Ser Lys Gly Val Cys Glu Ala Thr
 50 55 60

Cys Glu Pro Gly Cys Lys Phe Gly Glu Cys Val Gly Pro Asn Lys Cys
 65 70 75 80

10

Arg Cys Phe Pro Gly Tyr Thr Gly Lys Thr Cys Ser Gln Asp Val Asn
 85 90 95

Glu Cys Gly Met Lys Pro Arg Pro Cys Gln His Arg Cys Val Asn Thr
 100 105 110

20

His Gly Ser Tyr Lys Cys Phe Cys Leu Ser Gly His Met Leu Met Pro
 115 120 125

Asp Ala Thr Cys Val Asn Ser Arg Thr Cys Ala Met Ile Asn Cys Gln
 130 135 140

30

Tyr Ser Cys Glu Asp Thr Glu Glu Gly Pro Gln Cys Leu Cys Pro Ser
 145 150 155 160

Ser Gly Leu Arg Leu Ala Pro Asn Gly Arg Asp Cys Leu Asp Ile Asp
 165 170 175

Glu Cys Ala Ser Gly Lys Val Ile Cys Pro Tyr Asn Arg Arg Cys Val
 180 185 190

40

Asn Thr Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Lys Cys His Ile Gly Phe Glu Leu
 195 200 205

Gln Tyr Ile Ser Gly Arg Tyr Asp Cys Ile Asp Ile Asn Glu Cys Thr
 210 215 220

Met Asp Ser His Thr Cys Ser His His Ala Asn Cys Phe Asn Thr Gln
 225 230 235 240

Gly Ser Phe Lys Cys Lys Cys Lys Gln Gly Tyr Lys Gly Asn Gly Leu
 245 250 255

Arg Cys Ser Ala Ile Pro Glu Asn Ser Val Lys Glu Val Leu Arg Ala
 260 265 270

Pro Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ile Lys Lys Leu Leu Ala His Lys Asn
 275 280 285

Ser Met Lys Lys Lys Ala Lys Ile Lys Asn Val Thr Pro Glu Pro Thr
 290 295 300

Arg Thr Pro Thr Pro Lys Val Asn Leu Gln Pro Phe Asn Tyr Glu Glu
 305 310 315 320

Ile Val Ser Arg Gly Gly Asn Ser His Gly Gly Lys Lys Gly Asn Glu
 325 330 335

Glu Lys Met Lys Glu Gly Leu Glu Asp Glu Lys Arg Glu Glu Lys Ala

10

20

30

40

340	345	350	
Leu Lys Asn Asp Ile Glu Glu Arg Ser Leu Arg Gly Asp Val Phe Phe			
355	360	365	
Pro Lys Val Asn Glu Ala Gly Glu Phe Gly Leu Ile Leu Val Gln Arg			
370	375	380	10
Lys Ala Leu Thr Ser Lys Leu Glu His Lys Asp Leu Asn Ile Ser Val			
385	390	395	400
Asp Cys Ser Phe Asn His Gly Ile Cys Asp Trp Lys Gln Asp Arg Glu			
405	410	415	20
Asp Asp Phe Asp Trp Asn Pro Ala Asp Arg Asp Asn Ala Ile Gly Phe			
420	425	430	
Tyr Met Ala Val Pro Ala Leu Ala Gly His Lys Lys Asp Ile Gly Arg			
435	440	445	
Leu Lys Leu Leu Leu Pro Asp Leu Gln Pro Gln Ser Asn Phe Cys Leu			30
450	455	460	
Leu Phe Asp Tyr Arg Leu Ala Gly Asp Lys Val Gly Lys Leu Arg Val			
465	470	475	480
Phe Val Lys Asn Ser Asn Asn Ala Leu Ala Trp Glu Lys Thr Thr Ser			
485	490	495	40

Glu Asp Glu Lys Trp Lys Thr Gly Lys Ile Gln Leu Tyr Gln Gly Thr
 500 505 510

Asp Ala Thr Lys Ser Ile Ile Phe Glu Ala Glu Arg Gly Lys Gly Lys
 515 520 525

Thr Gly Glu Ile Ala Val Asp Gly Val Leu Leu Val Ser Gly Leu Cys
 530 535 540

10

Pro Asp Ser Leu Leu Ser Val Asp Asp
 545 550

<210> 25

20

<211> 403

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Ala His Ala Met Glu Asn Ser Trp Thr Ile Ser Lys Glu Tyr His
 1 5 10 15

30

Ile Asp Glu Glu Val Gly Phe Ala Leu Pro Asn Pro Gln Glu Asn Leu
 20 25 30

Pro Asp Phe Tyr Asn Asp Trp Met Phe Ile Ala Lys His Leu Pro Asp
 35 40 45

40

Leu Ile Glu Ser Gly Gln Leu Arg Glu Arg Val Glu Lys Leu Asn Met

50	55	60	
Leu Ser Ile Asp His Leu Thr Asp His Lys Ser Gln Arg Leu Ala Arg			
65	70	75	80
Leu Val Leu Gly Cys Ile Thr Met Ala Tyr Val Trp Gly Lys Gly His			
	85	90	95
			10
Gly Asp Val Arg Lys Val Leu Pro Arg Asn Ile Ala Val Pro Tyr Cys			
100	105	110	
Gln Leu Ser Lys Lys Leu Glu Leu Pro Pro Ile Leu Val Tyr Ala Asp			
115	120	125	
			20
Cys Val Leu Ala Asn Trp Lys Lys Lys Asp Pro Asn Lys Pro Leu Thr			
130	135	140	
Tyr Glu Asn Met Asp Val Leu Phe Ser Phe Arg Asp Gly Asp Cys Ser			
145	150	155	160
Lys Gly Phe Phe Leu Val Ser Leu Leu Val Glu Ile Ala Ala Ala Ser			
	165	170	175
			30
Ala Ile Lys Val Ile Pro Thr Val Phe Lys Ala Met Gln Met Gln Glu			
180	185	190	
Arg Asp Thr Leu Leu Lys Ala Leu Leu Glu Ile Ala Ser Cys Leu Glu			
195	200	205	40

Lys Ala Leu Gln Val Phe His Gln Ile His Asp His Val Asn Pro Lys
 210 215 220

Ala Phe Phe Ser Val Leu Arg Ile Tyr Leu Ser Gly Trp Lys Gly Asn
 225 230 235 240

Pro Gln Leu Ser Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Phe Trp Glu Asp Pro
 245 250 255

10

Lys Glu Phe Ala Gly Gly Ser Ala Gly Gln Ser Ser Val Phe Gln Cys
 260 265 270

Phe Asp Val Leu Leu Gly Ile Gln Gln Thr Ala Gly Gly Gly His Ala
 275 280 285

20

Ala Gln Phe Leu Gln Asp Met Arg Arg Tyr Met Pro Pro Ala His Arg
 290 295 300

Asn Phe Leu Cys Ser Leu Glu Ser Asn Pro Ser Val Arg Glu Phe Val
 305 310 315 320

30

Leu Ser Lys Gly Asp Ala Gly Leu Arg Glu Ala Tyr Asp Ala Cys Val
 325 330 335

Lys Ala Leu Val Ser Leu Arg Ser Tyr His Leu Gln Ile Val Thr Lys
 340 345 350

Tyr Ile Leu Ile Pro Ala Ser Gln Gln Pro Lys Glu Asn Lys Thr Ser
 355 360 365

40

Glu Asp Pro Ser Lys Leu Glu Ala Lys Gly Thr Gly Gly Thr Asp Leu
 370 375 380

Met Asn Phe Leu Lys Thr Val Arg Ser Thr Thr Glu Lys Ser Leu Leu
 385 390 395 400

10

Lys Glu Gly

<210> 26

<211> 99

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ile Ser
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu
 20 25 30

30

Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe
 35 40 45

Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr
 50 55 60

40

Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro
 65 70 75 80

Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala
 85 90 95

Glu Asn Ser

10

<210> 27

<211> 1163

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 27

Met Thr Arg Thr Arg Ala Ala Leu Leu Leu Phe Thr Ala Leu Ala Thr
 1 5 10 15

Ser Leu Gly Phe Asn Leu Asp Thr Glu Glu Leu Thr Ala Phe Arg Val
 20 25 30

30

Asp Ser Ala Gly Phe Gly Asp Ser Val Val Gln Tyr Ala Asn Ser Trp
 35 40 45

Val Val Val Gly Ala Pro Gln Lys Ile Thr Ala Ala Asn Gln Thr Gly
 50 55 60

40

Gly Leu Tyr Gln Cys Gly Tyr Ser Thr Gly Ala Cys Glu Pro Ile Gly

65	70	75	80	
Leu Gln Val Pro Pro Glu Ala Val Asn Met Ser Leu Gly Leu Ser Leu				
	85	90	95	
Ala Ser Thr Thr Ser Pro Ser Gln Leu Leu Ala Cys Gly Pro Thr Val				
	100	105	110	10
His His Glu Cys Gly Arg Asn Met Tyr Leu Thr Gly Leu Cys Phe Leu				
	115	120	125	
Leu Gly Pro Thr Gln Leu Thr Gln Arg Leu Pro Val Ser Arg Gln Glu				
	130	135	140	20
Cys Pro Arg Gln Glu Gln Asp Ile Val Phe Leu Ile Asp Gly Ser Gly				
145	150	155	160	
Ser Ile Ser Ser Arg Asn Phe Ala Thr Met Met Asn Phe Val Arg Ala				
	165	170	175	
Val Ile Ser Gln Phe Gln Arg Pro Ser Thr Gln Phe Ser Leu Met Gln				30
	180	185	190	
Phe Ser Asn Lys Phe Gln Thr His Phe Thr Phe Glu Glu Phe Arg Arg				
	195	200	205	
Thr Ser Asn Pro Leu Ser Leu Leu Ala Ser Val His Gln Leu Gln Gly				
	210	215	220	40

Phe Thr Tyr Thr Ala Thr Ala Ile Gln Asn Val Val His Arg Leu Phe
 225 230 235 240

His Ala Ser Tyr Gly Ala Arg Arg Asp Ala Thr Lys Ile Leu Ile Val
 245 250 255

Ile Thr Asp Gly Lys Lys Glu Gly Asp Ser Leu Asp Tyr Lys Asp Val
 260 265 270

10

Ile Pro Met Ala Asp Ala Ala Gly Ile Ile Arg Tyr Ala Ile Gly Val
 275 280 285

Gly Leu Ala Phe Gln Asn Arg Asn Ser Trp Lys Glu Leu Asn Asp Ile
 290 295 300

20

Ala Ser Lys Pro Ser Gln Glu His Ile Phe Lys Val Glu Asp Phe Asp
 305 310 315 320

Ala Leu Lys Asp Ile Gln Asn Gln Leu Lys Glu Lys Ile Phe Ala Ile
 325 330 335

30

Glu Gly Thr Glu Thr Thr Ser Ser Ser Ser Phe Glu Leu Glu Met Ala
 340 345 350

Gln Glu Gly Phe Ser Ala Val Phe Thr Pro Asp Gly Pro Val Leu Gly
 355 360 365

Ala Val Gly Ser Phe Thr Trp Ser Gly Gly Ala Phe Leu Tyr Pro Pro
 370 375 380

40

Asn Met Ser Pro Thr Phe Ile Asn Met Ser Gln Glu Asn Val Asp Met
 385 390 395 400

Arg Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Thr Glu Leu Ala Leu Trp Lys Gly
 405 410 415

Val Gln Ser Leu Val Leu Gly Ala Pro Arg Tyr Gln His Thr Gly Lys
 420 425 430

Ala Val Ile Phe Thr Gln Val Ser Arg Gln Trp Arg Met Lys Ala Glu
 435 440 445

Val Thr Gly Thr Gln Ile Gly Ser Tyr Phe Gly Ala Ser Leu Cys Ser
 450 455 460

Val Asp Val Asp Thr Asp Gly Ser Thr Asp Leu Val Leu Ile Gly Ala
 465 470 475 480

Pro His Tyr Tyr Glu Gln Thr Arg Gly Gly Gln Val Ser Val Cys Pro
 485 490 495

Leu Pro Arg Gly Trp Arg Arg Trp Trp Cys Asp Ala Val Leu Tyr Gly
 500 505 510

Glu Gln Gly His Pro Trp Gly Arg Phe Gly Ala Ala Leu Thr Val Leu
 515 520 525

Gly Asp Val Asn Gly Asp Lys Leu Thr Asp Val Val Ile Gly Ala Pro

10

20

30

40

530	535	540	
Gly Glu Glu Glu Asn Arg Gly Ala Val Tyr Leu Phe His Gly Val Leu			
545	550	555	560
Gly Pro Ser Ile Ser Pro Ser His Ser Gln Arg Ile Ala Gly Ser Gln			
	565	570	575
			10
Leu Ser Ser Arg Leu Gln Tyr Phe Gly Gln Ala Leu Ser Gly Gly Gln			
580	585	590	
Asp Leu Thr Gln Asp Gly Leu Val Asp Leu Ala Val Gly Ala Arg Gly			
595	600	605	
			20
Gln Val Leu Leu Leu Arg Thr Arg Pro Val Leu Trp Val Gly Val Ser			
610	615	620	
Met Gln Phe Ile Pro Ala Glu Ile Pro Arg Ser Ala Phe Glu Cys Arg			
625	630	635	640
Glu Gln Val Val Ser Glu Gln Thr Leu Val Gln Ser Asn Ile Cys Leu			
645	650	655	30
Tyr Ile Asp Lys Arg Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ser Arg Asp Leu Gln			
660	665	670	
Ser Ser Val Thr Leu Asp Leu Ala Leu Asp Pro Gly Arg Leu Ser Pro			
675	680	685	40

Arg Ala Thr Phe Gln Glu Thr Lys Asn Arg Ser Leu Ser Arg Val Arg
690 695 700

Val Leu Gly Leu Lys Ala His Cys Glu Asn Phe Asn Leu Leu Leu Pro
705 710 715 720

Ser Cys Val Glu Asp Ser Val Thr Pro Ile Thr Leu Arg Leu Asn Phe
725 730 735

10

Thr Leu Val Gly Lys Pro Leu Leu Ala Phe Arg Asn Leu Arg Pro Met
740 745 750

Leu Ala Ala Leu Ala Gln Arg Tyr Phe Thr Ala Ser Leu Pro Phe Glu
755 760 765

20

Lys Asn Cys Gly Ala Asp His Ile Cys Gln Asp Asn Leu Gly Ile Ser
770 775 780

Phe Ser Phe Pro Gly Leu Lys Ser Leu Leu Val Gly Ser Asn Leu Glu
785 790 795 800

30

Leu Asn Ala Glu Val Met Val Trp Asn Asp Gly Glu Asp Ser Tyr Gly
805 810 815

Thr Thr Ile Thr Phe Ser His Pro Ala Gly Leu Ser Tyr Arg Tyr Val
820 825 830

Ala Glu Gly Gln Lys Gln Gly Gln Leu Arg Ser Leu His Leu Thr Cys
835 840 845

40

Asp Ser Ala Pro Val Gly Ser Gln Gly Thr Trp Ser Thr Ser Cys Arg
 850 855 860

Ile Asn His Leu Ile Phe Arg Gly Gly Ala Gln Ile Thr Phe Leu Ala
 865 870 875 880

Thr Phe Asp Val Ser Pro Lys Ala Val Leu Gly Asp Arg Leu Leu Leu
 885 890 895

10

Thr Ala Asn Val Ser Ser Glu Asn Asn Thr Pro Arg Thr Ser Lys Thr
 900 905 910

Thr Phe Gln Leu Glu Leu Pro Val Lys Tyr Ala Val Tyr Thr Val Val
 915 920 925

20

Ser Ser His Glu Gln Phe Thr Lys Tyr Leu Asn Phe Ser Glu Ser Glu
 930 935 940

Glu Lys Glu Ser His Val Ala Met His Arg Tyr Gln Val Asn Asn Leu
 945 950 955 960

30

Gly Gln Arg Asp Leu Pro Val Ser Ile Asn Phe Trp Val Pro Val Glu
 965 970 975

Leu Asn Gln Glu Ala Val Trp Met Asp Val Glu Val Ser His Pro Gln
 980 985 990

40

Asn Pro Ser Leu Arg Cys Ser Ser Glu Lys Ile Ala Pro Pro Ala Ser

995	1000	1005	
Asp Phe Leu Ala His Ile Gln Lys Asn Pro Val Leu Asp Cys Ser Ile			
1010	1015	1020	
Ala Gly Cys Leu Arg Phe Arg Cys Asp Val Pro Ser Phe Ser Val Gln			
1025	1030	1035	1040
			10
Glu Glu Leu Asp Phe Thr Leu Lys Gly Asn Leu Ser Phe Gly Trp Val			
1045	1050	1055	
Arg Gln Ile Leu Gln Lys Lys Val Ser Val Val Ser Val Ala Glu Ile			
1060	1065	1070	
			20
Thr Phe Asp Thr Ser Val Tyr Ser Gln Leu Pro Gly Gln Glu Ala Phe			
1075	1080	1085	
Met Arg Ala Gln Thr Thr Thr Val Leu Glu Lys Tyr Lys Val His Asn			
1090	1095	1100	
Pro Thr Pro Leu Ile Val Gly Ser Ser Ile Gly Gly Leu Leu Leu Leu			
1105	1110	1115	1120
			30
Ala Leu Ile Thr Ala Val Leu Tyr Lys Val Gly Phe Phe Lys Arg Gln			
1125	1130	1135	
Tyr Lys Glu Met Met Glu Glu Ala Asn Gly Gln Ile Ala Pro Glu Asn			
1140	1145	1150	40

Gly Thr Gln Thr Pro Ser Pro Pro Ser Glu Lys

1155

1160

<210> 28

<211> 784

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Pro His Thr Leu Trp Met Val Trp Val Leu Gly Val Ile Ile Ser

1

5

10

15

Leu Ser Lys Glu Glu Ser Ser Asn Gln Ala Ser Leu Ser Cys Asp Arg

20

25

30

20

Asn Gly Ile Cys Lys Gly Ser Ser Gly Ser Leu Asn Ser Ile Pro Ser

35

40

45

Gly Leu Thr Glu Ala Val Lys Ser Leu Asp Leu Ser Asn Asn Arg Ile

50

55

60

30

Thr Tyr Ile Ser Asn Ser Asp Leu Gln Arg Cys Val Asn Leu Gln Ala

65

70

75

80

Leu Val Leu Thr Ser Asn Gly Ile Asn Thr Ile Glu Glu Asp Ser Phe

85

90

95

40

Ser Ser Leu Gly Ser Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Tyr Leu

100	105	110	
Ser Asn Leu Ser Ser Ser Trp Phe Lys Pro Leu Ser Ser Leu Thr Phe			
115	120	125	
Leu Asn Leu Leu Gly Asn Pro Tyr Lys Thr Leu Gly Glu Thr Ser Leu			
130	135	140	10
Phe Ser His Leu Thr Lys Leu Gln Ile Leu Arg Val Gly Asn Met Asp			
145	150	155	160
Thr Phe Thr Lys Ile Gln Arg Lys Asp Phe Ala Gly Leu Thr Phe Leu			
165	170	175	20
Glu Glu Leu Glu Ile Asp Ala Ser Asp Leu Gln Ser Tyr Glu Pro Lys			
180	185	190	
Ser Leu Lys Ser Ile Gln Asn Val Ser His Leu Ile Leu His Met Lys			
195	200	205	
Gln His Ile Leu Leu Leu Glu Ile Phe Val Asp Val Thr Ser Ser Val			
210	215	220	30
Glu Cys Leu Glu Leu Arg Asp Thr Asp Leu Asp Thr Phe His Phe Ser			
225	230	235	240
Glu Leu Ser Thr Gly Glu Thr Asn Ser Leu Ile Lys Lys Phe Thr Phe			
245	250	255	40

Arg Asn Val Lys Ile Thr Asp Glu Ser Leu Phe Gln Val Met Lys Leu
 260 265 270

Leu Asn Gln Ile Ser Gly Leu Leu Glu Leu Glu Phe Asp Asp Cys Thr
 275 280 285

Leu Asn Gly Val Gly Asn Phe Arg Ala Ser Asp Asn Asp Arg Val Ile
 290 295 300

10

Asp Pro Gly Lys Val Glu Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu His Ile Pro
 305 310 315 320

Arg Phe Tyr Leu Phe Tyr Asp Leu Ser Thr Leu Tyr Ser Leu Thr Glu
 325 330 335

20

Arg Val Lys Arg Ile Thr Val Glu Asn Ser Lys Val Phe Leu Val Pro
 340 345 350

Cys Leu Leu Ser Gln His Leu Lys Ser Leu Glu Tyr Leu Asp Leu Ser
 355 360 365

30

Glu Asn Leu Met Val Glu Glu Tyr Leu Lys Asn Ser Ala Cys Glu Asp
 370 375 380

Ala Trp Pro Ser Leu Gln Thr Leu Ile Leu Arg Gln Asn His Leu Ala
 385 390 395 400

Ser Leu Glu Lys Thr Gly Glu Thr Leu Leu Thr Leu Lys Asn Leu Thr
 405 410 415

40

Asn Ile Asp Ile Ser Lys Asn Ser Phe His Ser Met Pro Glu Thr Cys
 420 425 430

Gln Trp Pro Glu Lys Met Lys Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Thr Arg Ile
 435 440 445

His Ser Val Thr Gly Cys Ile Pro Lys Thr Leu Glu Ile Leu Asp Val
 450 455 460

Ser Asn Asn Asn Leu Asn Leu Phe Ser Leu Asn Leu Pro Gln Leu Lys
 465 470 475 480

Glu Leu Tyr Ile Ser Arg Asn Lys Leu Met Thr Leu Pro Asp Ala Ser
 485 490 495

Leu Leu Pro Met Leu Leu Val Leu Lys Ile Ser Arg Asn Ala Ile Thr
 500 505 510

Thr Phe Ser Lys Glu Gln Leu Asp Ser Phe His Thr Leu Lys Thr Leu
 515 520 525

Glu Ala Gly Gly Asn Asn Phe Ile Cys Ser Cys Glu Phe Leu Ser Phe
 530 535 540

Thr Gln Glu Gln Gln Ala Leu Ala Lys Val Leu Ile Asp Trp Pro Ala
 545 550 555 560

Asn Tyr Leu Cys Asp Ser Pro Ser His Val Arg Gly Gln Gln Val Gln

10

20

30

40

565	570	575	
Asp Val Arg Leu Ser Val Ser Glu Cys His Arg Thr Ala Leu Val Ser			
580	585	590	
Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile Leu Leu Thr Gly Val Leu			
595	600	605	10
Cys His Arg Phe His Gly Leu Trp Tyr Met Lys Met Met Trp Ala Trp			
610	615	620	
Leu Gln Ala Lys Arg Lys Pro Arg Lys Ala Pro Ser Arg Asn Ile Cys			
625	630	635	20
Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Ser Glu Arg Asp Ala Tyr Trp Val Glu			
645	650	655	
Asn Leu Met Val Gln Glu Leu Glu Asn Phe Asn Pro Pro Phe Lys Leu			
660	665	670	
Cys Leu His Lys Arg Asp Phe Ile Pro Gly Lys Trp Ile Ile Asp Asn			30
675	680	685	
Ile Ile Asp Ser Ile Glu Lys Ser His Lys Thr Val Phe Val Leu Ser			
690	695	700	
Glu Asn Phe Val Lys Ser Glu Trp Cys Lys Tyr Glu Leu Asp Phe Ser			
705	710	715	40
		720	

His Phe Arg Leu Phe Glu Glu Asn Asn Asp Ala Ala Ile Leu Ile Leu
 725 730 735

Leu Glu Pro Ile Glu Lys Lys Ala Ile Pro Gln Arg Phe Cys Lys Leu
 740 745 750

Arg Lys Ile Met Asn Thr Lys Thr Tyr Leu Glu Trp Pro Met Asp Glu
 755 760 765

10

Ala Gln Arg Glu Gly Phe Trp Val Asn Leu Arg Ala Ala Ile Lys Ser
 770 775 780

(210) 29

20

(211) 1123

(212) DNA

(213) Homo sapiens

(400) 29

aagcagtggt atcaacgcag agtgcgccatt acggccgggg gttggcatcat gttggcagctg 60
 ctctctccaa ctgctctgct acttctagtt tcagctggca tgcggactga agatctccca 120
 aaggctgtgg tgttcttgga gccatcaatgg tacagggtgc tcgagaagga cagigtgact 180
 ctgaagtgcc agggagccta ctccccigag gacaattcca cacagtggtt tcacaatgag 240
 agcctcatct caagccaggc ctcgagctac ttcatgacg ctgccacagt cgacgacagt 300
 ggagagtaca ggigccagac aaacctctcc acctcagtg acccgggtgca gctagaagtc 360
 catatcggct ggctgttgct ccaggccctt cggtggtgt tcaaggagga agacctatt 420
 cactgaggt gtcacagctg gaagaacact gctcgcata aggtcacata ttacagaat 480
 ggcaaaaggca ggaagtattt tcatcataat tcgacttct acattccaaa agccacactc 540
 aaagacagcg gctcctactt ctgcaggggg ctigtgtgga gtaaaaatgt gctttcagag 600

30

40

actgtgaaca tcaccatcac tcaaggittg gcagigtcaa ccatcicac attctttcca 660
 cctgggtacc aagtctcttt ctgcttggig atggtactcc ttttgcagt ggacacagga 720
 ctatatctct ctgtgaagac aaacattcga agctcaacaa gagactggaa ggaccataaa 780
 tttaaatgga gaaaggaccc tcaagacaaa tgaccccat cccatggggg taataagagc 840
 agtagcagca gcatctctga acatttctct ggatttgcaa cctatcacc ctcaggccctc 900
 tctacaagca gcaggaaaca tagaacticag agccagatcc ctatccaac tctcgacttt 960
 tcttggict ccagtggaag ggaaaagccc atgacttcca agcagggaag ccccgatgag 1020
 tagctgcatt cctagaaatt gaagtttcag agctacacaa acacttttcc tgtcccaacc 1080
 gtccctcac agcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1123

10

(210) 30

(211) 254

20

(212) PRT

(213) Homo sapiens

(400) 30

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15

30

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60

40

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

10

20

30

40

210

215

220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp

225

230

235

240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

245

250

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

G 0 1 N 33/15

G 0 1 N 33/15

Z

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/50

Z

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

D

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/53

M

G 0 1 N 33/566

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02

FB03

4B024 AA11 AA19 CA04 CA09 CA11 HA14 HA19

4B063 QA13 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR48 QR55

QR62 QR77 QS25 QS34

4C084 AA17 NA14 ZA68 ZB11

10 10 10 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)